

REC'D 25 JUL 2000

WIPO

PCT

대한민국 특허청

KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

KR00/00733

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

534

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 특허출원 1999년 제 27418 호
Application Number

출원년월일 : 1999년 07월 08일
Date of Application

출원인 : 한미약품공업 주식회사
Applicant(s)

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



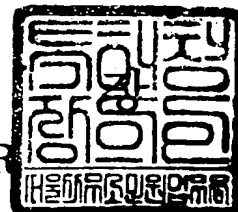
2000 년 06 월 19 일

특

허

청

COMMISSIONER



【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0002
【제출일자】	1999.07.08
【발명의 명칭】	인간 과립구 콜로니 자극인자 변이체 및 이의 생산 방법
【발명의 영문명칭】	MODIFIED HUMAN GRANULOCYTE-COLONY STIMULATING FACTOR AND P ROCESS FOR PRODUCING SAME
【출원인】	
【명칭】	한미약품공업 주식회사
【출원인코드】	1-1998-004411-2
【대리인】	
【성명】	오규환
【대리인코드】	9-1998-000435-1
【포괄위임등록번호】	1999-023920-9
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	1999-023919-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	권세창
【성명의 영문표기】	KWON, Se Chang
【주민등록번호】	630620-1024818
【우편번호】	153-031
【주소】	서울특별시 금천구 시흥1동 789 한양아파트 5-201
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정성엽
【성명의 영문표기】	JUNG, Sung Youb
【주민등록번호】	691121-1047631
【우편번호】	138-112
【주소】	서울특별시 송파구 거여2동 294 거여아파트 504-1402
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 최기두
【성명의 영문표기】 CHOI, Ki Doo
【주민등록번호】 700110-1109416
【우편번호】 135-243
【주소】 서울특별시 강남구 개포3동 개포주공아파트 601-407

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김차순
【성명의 영문표기】 KIM, Cha Soon
【주민등록번호】 700216-1121024
【우편번호】 449-840
【주소】 경기도 용인시 수지읍 풍덕천리 664 풍림아파트 106-903
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 최재도
【성명의 영문표기】 CHOI, Jay Do
【주민등록번호】 661115-1545911
【우편번호】 134-033
【주소】 서울특별시 강동구 성내3동 동아1차아파트 502호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이관순
【성명의 영문표기】 LEE, Guan Soon
【주민등록번호】 600110-1471553
【우편번호】 138-160
【주소】 서울특별시 송파구 가락동 극동아파트 2-806
【국적】 KR

【심사청구】 청구

【미생물기탁】

【기탁기관명】 한국미생물보존센터
【수탁번호】 KCCM-10151
【수탁일자】 1999.03.24

【미생물기탁】

【기탁기관명】 한국미생물보존센터

【수탁번호】 KCCM-10152

【수탁일자】 1999.03.24

【미생물기탁】

【기탁기관명】 한국미생물보존센터

【수탁번호】 KCCM-10153

【수탁일자】 1999.03.24

【미생물기탁】

【기탁기관명】 한국미생물보존센터

【수탁번호】 KCCM-10154

【수탁일자】 1999.03.24

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 071

【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
오규환 (인) 대리인
장성구 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 92 면 92,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 25 항 909,000 원

【합계】 1,030,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 인간 과립구 콜로니 자극인자(human granulocyte-colony stimulating factor; hG-CSF) 변이체, 이를 코드하는 DNA, 이를 포함하는 발현벡터, 및 상기 발현벡터로 형질전환된 세포주에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 hG-CSF 변이체를 코딩하는 유전자 및 그의 5'-말단에 연결된 분비서열 유전자를 포함하는 발현 벡터로 대장균을 형질 전환시키고, 형질전환된 대장균을 적절한 조건하에 배양함으로써 아미노 말단에 추가의 메티오닌이 첨가되지 않은 hG-CSF 변이체를 대장균 페리플라즈م 내로 분비 생산하는 방법에 관한 것이다.

【대표도】

도 11

【명세서】

【발명의 명칭】

인간 과립구 콜로니 자극인자 변이체 및 이의 생산 방법{Modified Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor and Process for Producing Same}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 174개의 아미노산으로 이루어진 천연형 인간 과립구 콜로니 자극인자(hG-CSF)의 뉴클레오티드 서열(서열번호: 1) 및 아미노산 서열(서열번호: 2)을 나타낸 것이다.

도 2는 플라스미드 pT-CSF의 제작과정을 나타낸 것이다.

도 3은 플라스미드 pT14S1SG의 제작과정을 나타낸 것이다.

도 4는 플라스미드 pT14SS1SG의 제작과정을 나타낸 것이다.

도 5는 플라스미드 pT14OSSG-4T22Q의 제작과정을 나타낸 것이다.

도 6은 플라스미드 pT14SS1S17SEG의 제작과정을 나타낸 것이다.

도 7은 플라스미드 pT01SG의 제작과정을 나타낸 것이다.

도 8은 플라스미드 pBADG의 제작과정을 나타낸 것이다.

도 9는 플라스미드 pBAD2M3VG의 제작과정을 나타낸 것이다.

도 10a 및 10b는 재조합 균주로부터 hG-CSF 및 그의 변이체들의 발현여부 및 발현된 단백질의 분자량을 확인한 웨스턴 블라팅의 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 재조합 균주로부터 생산된 hG-CSF 및 그의 변이체들의 세포내 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<12> 본 발명은 인간 과립구 콜로니 자극인자(human granulocyte-colony stimulating factor; hG-CSF)의 변이체 및 그의 생산 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 hG-CSF 변이체, 이를 코딩하는 DNA, 이를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터로 형질전환된 세포주, 및 hG-CSF 변이체를 코딩하는 유전자와 이 유전자의 5'-말단에 연결된 분비서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 대장균을 배양함으로써 아미노 말단에 추가의 메티오닌이 첨가되지 않은 hG-CSF 활성을 갖는 단백질을 페리플라즘으로 분비시켜 대량으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

<13> 콜로니 자극인자(colony stimulating factor; CSF)로 통칭되는 인자는 T-세포, 단구성 대식세포, 섬유아세포 및 내피세포와 같은 세포에서 생산되는 것으로 알려져 있으며, 이들 세포는 정상적으로 생체내에 광범위하게 분포되어 있다. CSF에는 과립성 백혈구 또는 단구성 대식세포의 간 세포(stem cell)에 작용하여 그 증식을 자극하고 분화를 유도하여 과립성 백혈구 또는 단구성 대식세포의 콜로니를 형성시키는 작용을 갖는 과립성 백혈구-단구성 대식세포 콜로니 자극인자(GM-CSF)와 주로 단구성 대식세포의 콜로니를 형성시키는 작용을 갖는 단구성 대식세포 콜로니 자극인자(M-CSF)가 있다. 또한, 본

발명에서와 같이 과립성 백혈구의 콜로니를 형성시키는 작용을 갖는 과립성 백혈구 콜로니 자극인자(G-CSF) 등이 존재한다고 알려져 있다.

<14> G-CSF의 생물학적 작용은 골수 백혈구 세포의 분화를 유도하고 성숙한 과립성 백혈구의 기능을 증진시키는 것으로 백혈병의 치료 및 항암제 병용 투여제로 임상적 중요성이 알려져 있다.

<15> 한편, 생체내 hG-CSF는 174개 또는 177개의 아미노산으로 구성된 단백질로 체내에서 생성되나 호중구 증가 활성은 174개의 아미노산을 가진 hG-CSF가 우수한 것으로 알려져 있다(Morishita, K. et al., *J. Biol. Chem.*, 262, 15208-15213(1987)). 174개의 아미노산으로 이루어진 hG-CSF의 아미노산 서열은 도 1에 나타나 있으며, 이의 유전자를 이용하여 대량생산 연구가 진행되어 왔다.

<16> 종래 G-CSF를 분리, 정제하는 방법으로는 세포를 배양하여 그 상층액으로부터 G-CSF를 분리하는 세포배양법이 이용되어 왔으나, 이때 G-CSF가 낮은 농도로만 생산되며, 대량의 배양액으로부터 극미량의 G-CSF를 얻기 위해서는 복잡한 정제공정이 요구되어 왔다.

<17> 기존의 생산 방법으로서 일본의 슈가이사는 hG-CSF의 아미노산 서열 및 이를 코딩하는 유전자를 밝혀내었고(대한민국 특허 공고 제 91-5624 호 및 제 92-2312 호), 이를 이용하여 hG-CSF 활성을 가진 물질을 유전자 재조합 방법으로 제조하는 방법을 개시하였다(대한민국 특허 제 47178 호, 제 53723 호 및 제 57582 호). 이들의 방법은 hG-CSF 아미노산 서열을 함유하는 게놈 DNA 유전자 또는 cDNA 유전자를 이용하여 포유동물 세포로부터 당쇄화된 hG-CSF 당단백질을 제조하는 방법이다.

상기 특허들에서 제조된 당쇄화된 hG-CSF는 O-글라이코시딕 당쇄 구조를 가지고 있으나 당은 hG-CSF 활성화에 필수적이지 않은 것으로 이미 공지되어 있다(Lawrence, M. et al., , 232, 61(1986)). 또한 포유동물세포를 이용하여 당쇄화된 hG-CSF를 수득하기 위해서는 고가의 배지 및 생산 방법이 드는 것은 주지의 사실이다.

<18> 또한, 원핵세포를 이용하여 비당쇄화된 hG-CSF를 수득하는 방법에 있어서는 사용한 대장균의 특성에 따라 개시코돈 위치에 존재하는 ATG 코돈에 의해 아미노 말단 위치에 메티오닌 잔기가 하나 더 첨가된 175개 또는 178개 아미노산으로 구성된 hG-CSF가 만들어지게 되고, 부가된 메티오닌 잔기로 인해 인체에 유해한 면역반응이 유발될 수 있다고 알려져 있다(유럽 특허공개 제 256,843 호). 또한 기존의 방법처럼 대장균을 숙주로 사용하면, 대부분의 hG-CSF는 불용성 물질로 세포질 내에 축적되므로 리폴딩 공정을 거쳐 활성화된 형태로 얻어야 하는데 이때 역가의 손실이 많이 된다. 그리고 hG-CSF는 5개의 시스테인 잔기를 가지고 있으며 이중 4개는 다이설파이드 결합에 관여하고 1개의 시스테인 잔기는 자유로운 상태를 가지면서 폴딩의 역가 뿐만 아니라 단백질의 용액내 안정성을 낮춘다는 문제점을 피할수 없게 된다. 그리고 포유동물 세포배양을 이용해 얻은 당쇄화된 hG-CSF는 O-글라이코시딕 당쇄구조를 가지고 있으며 당은 비록 hG-CSF 활성화에 필수적이지 않지만 이미 공지된 것처럼 고농도에서 응집(aggregation)을 방지시켜 주는 것으로 알려져 있다. 그러나 대장균에서 발현된 비당쇄화된 hG-CSF는 낮은 용해도 때문에 고농도시 쉽게 응집되는 문제점도 가지고 있다.

<19> 최근 유전자 재조합기술에 의해, 미생물을 숙주로서 유용단백질을 생산하는 것이 가능하게 되었으며, 주된 것으로 균체내 생산방법과 분비 생산방법을 들 수 있다.

<20> 균체내 생산방법은 세포질내에 목적 단백질을 생산시키는 방법이며, 높은 생산량을 얻게 되는 것이 알려져 있다. 그러나, 세포질내에 생산 축적한 단백질은 천연형 아미노산 배열의 N-말단에 메티오닌이 부가되며, 다량으로 생산된 재조합 단백질은 통상 불용성 형태로 얻어지게 되어, 추출 조작 후에 천연형과는 다른 고차구조를 형성하기 쉽다.

그 때문에, 균체내 생산방법에 있어서는 단백질의 고차구조를 천연형으로 바꾸기 위한 리폴딩의 공정이 필요하며, 이것은 제조공정에서 번잡한 공정이 추가로 필요함을 의미한다.

<21> 한편 분비 생산방법에서는, 목적하는 재조합 단백질은 N-말단에 분비서열이 부가된 융합 단백질로서 발현된다. 이 융합 단백질이 세포질막을 투과할 때, 분비서열은 대장균내의 효소에 의해 프로세싱되어 절단되고 천연형 형태로 목적 단백질이 분비된다. 분비 생산방법에서는 아미노산 배열 및 고차구조가 모두 천연형과 동일한 단백질을 얻을 수 있으므로 균체내 생산방법보다 유리하다. 그러나 분비 생산방법은 균체내 생산방법에 비해서 막투과 및 프로세싱의 과정이 필요하기 때문에 생산량이 낮다. 특히, 포유류 유래의 단백질을 원핵생물을 사용해서 분비 생산하면, 원핵생물 유래의 단백질을 분비 생산시킨 경우에 비해 생산 효율이 매우 낮은 것으로 알려져 있으므로, 보다 뛰어난 분비 생산방법이 요망된다.

<22> 최근, 미생물의 단백질 분비에 관여하는 여러 인자들이 알려지고, 이를 이용해서 단백질을 효율 좋게 분비 생산하는 방법의 연구가 진행되고 있다. 그 하나로 분비서열에 대한 연구를 들 수 있다. 미생물이 단백질을 분비하는 데는, 상술한 바와 같이 세포질 내에서 합성된 융합단백질이 세포질막을 투과해서, 프로세싱에 의해 정확한 절단이 필요하다.

<23> 분비서열에 있어, N-말단의 정전하 영역의 양전하 부위와 중앙부 소수영역의 수가 중요한 것이 알려졌고, 이를 이용하는 연구도 진행되고 있다. 우타카등은 바실러스 브레비스(*Bacillus brevis*)를 숙주로서 사용하는 분비생산에 있어서, 바실러스 브레비스의 중간 외막 단백질의 분비서열 중 N-말단 부위에 염기성 아미노산인 아르기닌(Arg)을 부가하고, 또한 중앙 부위에 소수성 아미노산인 루이신(Leu)을 부가하는 변형체를 제조하여 분비효율을 높였다고 보고한 바 있다(일본국 특허 공개 제 평7-51072 호). 그러나 이 분비서열의 변형체에 대한 보편적인 지도원리는 없고, 시행착오에 의해 바람직한 배열을 발견하지 않으면 안되는 어려움이 있다.

<24> 따라서, 미생물을 이용하여 아미노 말단에 메티오닌 잔기가 부가되지 않은 가용성 hG-CSF를 대량으로 얻을 수 있는 방법이 요구되고 있다.

<25> 이에 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하고자 예의 연구한 결과 이미 알려진 대장균(*E. coli*)의 분비 단백질인 열안정성 엔테로톡신 II의 분비서열을 변화시켜 높은 발현률을 나타내는 새로운 분비서열을 제조하였고(한국 특허출원 제 98-38061 호), 이를 이용하여 천연형 hG-CSF를 얻을 수 있음을 알게 되었다. 즉, 대장균의 열안정성 엔테로톡신 II의 변형된 분비서열 다음에 엔테로톡신 유전자 대신 hG-CSF 유전자를 연결시킨 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조하고 이를 이용하여 대장균을 형질전환시킴으로써 미생물의 분비 시스템을 이용하여 생물학적 활성을 갖는 천연형 hG-CSF를 발현시켰다. 그러나 상당 부분의 hG-CSF는 페리플라즈م 보다 세포질 내에 축적 되었고, 프로세싱으로 진행되지 않은 상태로 남아 있었다. 이로부터 본 발명자들이 개발한 대장균의 열안정성 엔테로톡신 II의 변형 분비서열을 사용하여도 hG-CSF의 발현량은 매우 증가하지만 세포 내 생산과 비슷한 양상으로 발현됨을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명자들은 천연형

과 동일한 역가를 갖는 hG-CSF의 발현량을 크게 증가시킬 수 있는 방법을 개발하기 위해 끊임없이 노력한 결과, hG-CSF의 일부 아미노산 잔기, 특히 17번째 시스테인 잔기를 다른 아미노산 잔기로 치환하여 제조된 hG-CSF 변이체의 유전자를 분비서열과 연결하여 발현시킬 경우 아미노 말단에 메티오닌 잔기가 부가되지 않은 형태로 페리플라즘으로 대량 생산할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <26> 본 발명의 목적은 미생물에 의해 대량으로 분비 생산될 수 있는 hG-CSF의 변이체를 제공하는 것이다.
- <27> 본 발명의 다른 목적은 상기 hG-CSF 변이체를 코드하는 DNA 및 이를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.
- <28> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터로 형질전환된 미생물을 제공하는 것이다.
- <29> 본 발명의 또 다른 목적은 아미노 말단에 메티오닌 잔기가 부가되지 않은 가용성 hG-CSF를 대량으로 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <30> 상기 목적에 따라, 본 발명에서는 대량 발현이 가능한 인간 과립구 콜로니 자극인자(hG-CSF) 변이체, 이를 코드하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 발현벡터, 및 상기 발현벡터로 형질전환된 미생물을 제공한다.
- <31> 본 발명의 hG-CSF 변이체는 분비서열과 연결하여 발현시킬 경우 대장균과 같은 미

생물 내에서 아미노 말단에 메티오닌이 부가되지 않은 형태로 대량으로 분비 생산될 수 있는 것들로서, 도 1에 기재된 174개의 아미노산으로 이루어진 천연형 hG-CSF의 1번, 2번, 3번 및 17번 아미노산 중 하나 이상이 다른 아미노산으로 치환된 것들을 포함한다.

<32> 특히, 1번 트레오닌; 2번 프롤린 및 3번 로이신; 17번 시스테인; 1번 트레오닌 및 17번 시스테인; 및 2번 프롤린, 3번 로이신 및 17번 트레오닌이 각각 다른 아미노산으로 치환된 변이체들이 바람직하며, 17번 시스테인이 치환될 경우에는 중성 pH에서 전하를 띠지 않는 아미노산으로 치환되는 것이 더욱 바람직하다. 가장 바람직한 본 발명의 변이체들은 1번 트레오닌이 세린으로 치환된 것([Ser¹] hG-CSF); 2번 프롤린이 메티오닌으로, 3번 로이신이 발린으로 각각 치환된 것([Met², Val³] hG-CSF); 17번 시스테인이 세린, 트레오닌, 알라닌 또는 글리신으로 치환된 것([Ser¹⁷, Thr¹⁷, Ala¹⁷ 또는 Gly¹⁷] hG-CSF); 1번 트레오닌 및 17번 시스테인이 각각 세린으로 치환된 것([Ser¹, Ser¹⁷] hG-CSF); 및 2번 프롤린이 메티오닌으로, 3번 로이신이 발린으로, 17번 트레오닌이 세린으로 각각 치환된 것([Met², Val³, Ser¹⁷] hG-CSF)들이다. [Ser¹, Ser¹⁷] hG-CSF; [Ser¹] hG-CSF; [Ser¹⁷] hG-CSF; [Thr¹⁷] hG-CSF; [Ala¹⁷] hG-CSF; [Gly¹⁷] hG-CSF; [Met², Val³] hG-CSF; 및 [Met², Val³, Ser¹⁷] hG-CSF의 N-말단 32개 아미노산의 서열은 각각 서열번호: 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68 및 70과 같으며, 그 이후의 아미노산 서열은 천연형 hG-CSF와 같다.

<33> 천연형 hG-CSF는 5개의 시스테인 잔기를 가지고 있으며 이중 4개는 다이설파이드 결합에 관여하고 17번 시스테인 잔기는 자유로운 상태를 가지므로, 대량생산시 17번 시스테인 잔기가 다른 시스테인 잔기와 다이설파이드 결합을 함으로써 hG-CSF의 발현량을

매우 낮추게 되거나 hG-CSF가 응집되어 세포질내에 축적되는 문제점이 있을 것으로 판단된다. 그러나, 17번 시스테인 잔기가 다른 아미노산으로 치환된 본 발명의 hG-CSF 변이체에서는 17번 시스테인이 다른 시스테인 잔기들과 다이설파이드 결합을 하지 못하므로 상기 문제점 없이 효율적으로 분비생산될 수 있다. 또한 아미노 말단 잔기들은 단백질 3차구조에 직접적인 영향을 주지 않는 자유로운 형태의 구조를 가질 것으로 판단되므로 분비 효율을 더욱 증가시키기 위해서는 아미노 말단의 잔기들을 다른 여러 아미노산으로 치환할 수 있다.

<34> 본 발명에서는 상기 hG-CSF 변이체를 코딩하는 유전자를 역시 제공하며, 본 발명의 예시적인 hG-CSF 변이체들, 즉, [Ser¹] hG-CSF; [Met², Val³] hG-CSF; [Ser¹⁷] hG-CSF; [Thr¹⁷] hG-CSF; [Ala¹⁷] hG-CSF; [Gly¹⁷] hG-CSF; [Ser¹, Ser¹⁷] hG-CSF; 및 [Met², Val³, Ser¹⁷] hG-CSF의 N-말단 32개 아미노산을 코딩하는 유전자들은 각각 서열번호: 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67 및 69의 염기 서열을 가지며, 그 이후의 서열은 천연형 hG-CSF의 것과 동일하다. 그러나, 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인해 본 발명의 변이체를 코딩하는 다양한 유전자가 존재할 수 있으며, 특히 아미노산 서열에 영향을 주지 않고 대장균이 선호하는 코돈을 선택함으로써 변이체의 발현량을 훨씬 증가시킬 수도 있다.

<35> 본 발명의 벡터는 상기에 개시된 hG-CSF 변이체를 코딩하는 유전자를 포함하며, hG-CSF 변이체의 분비 생산을 위해 분비서열 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 벡터에 사용할 수 있는 분비서열로는, 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열(서열번호: 53), 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변형체(서열번호: 54), 베타 락타마제 분비서열(서열번호: 24), Gene III 분비서열(서열번호: 42) 또는 이들의 변형체 등을

사용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 또한, 본 발명의 벡터에서 프로모터로서는 미생물에서 이중 단백질의 발현에 사용될 수 있는 임의의 프로모터도 사용할 수 있으며, 대장균에서 발현시킬 경우 lac 프로모터, Tac 프로모터, 아라비노즈 프로모터 등을 예로 들 수 있다.

<36> 본 발명에서는 상기 벡터로 미생물, 예를 들어 대장균 BL21(DE3)(노바젠사), 대장균 XL-1 blue(노바젠사)와 같은 대장균 균주들을 형질전환시켜 제조된 형질전환체가 역시 제공된다. 이러한 형질전환체로서는 본 발명의 실시예에서 제조된 대장균 BL21(DE3)/pT14SS1SG(HM 10310), 대장균 BL21(DE3)/pT14SS1S17SEG(HM 10311; 기탁번호: KCCM-10154), 대장균 BL21(DE3)/pT01SG(HM 10409), 대장균 BL21(DE3)/pT01S17SG(HM 10410; 기탁번호: KCCM-10151), 대장균 BL21(DE3)/pT017SG(HM 10411; 기탁번호: KCCM-10152), 대장균 BL21(DE3)/pT017TG(HM 10413), 대장균 BL21(DE3)/pT017AG(HM 10414), 대장균 BL21(DE3)/pT017GG(HM 10415), 대장균 BL21(DE3)/pBAD2M3VG(HM 10510; 기탁번호: KCCM-10153), 대장균 BL21(DE3)/pBAD17SG(HM 10511) 또는 대장균 BL21(DE3)/pBAD2M3V17SG(HM 10512) 등을 예시할 수 있다.

<37> 또한, 본 발명에서는 hG-CSF 변이체를 코딩하는 유전자 및 그의 5'-말단에 연결된 분비서열 유전자를 포함하는 발현 벡터로 대장균을 형질전환시키고, 형질전환된 대장균을 적절한 조건하에 배양함으로써 아미노 말단에 추가의 메티오닌이 첨가되지 않은 hG-CSF 변이체를 대장균 페리플라즈م 내로 분비 생산하는 방법을 제공한다.

<38> 본 발명의 방법에 사용할 수 있는 hG-CSF 변이체 유전자, 분비서열 유전자, hG-CSF 발현 벡터, 및 이 발현 벡터로 형질전환된 대장균은 상기에 설명한 바와 같다.

<39> 본 발명의 분비 생산방법에 따르면, 대장균 형질전환체를 이용하는 경우 hG-CSF를

배양배지 1 L당 1g 이상의 높은 수율로 분비 생산할 수 있고, 이렇게 대량 생산된 hG-CSF는 세포내에서 천연형의 hG-CSF에 비해 동등 이상의 우수한 생물학적 역가를 나타낸다.

<40> 본 발명은 하기 실시예를 통하여 상세히 설명되고 있다. 그러나 하기 실시예는 본

발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 본 발명이 이에 의해 한정되는 것은 아니다.

<41> 실시예 1: hG-CSF의 유전자 제작

<42> 다음과 같이, cDNA 라이브러리를 이용하는 방법(미국특허 제 4,810,643 호)을 사용하여 hG-CSF의 cDNA를 얻었다. 즉, 상기 미국 특허에 개시된 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머들을 사용하고, hG-CSF의 염기 서열을 주형으로 하여 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)법에 의해 hG-CSF 유전자를 증폭시켰다.

<43> 얻어진 hG-CSF cDNA의 앞부분에는 시그널 펩타이드가 포함되어 있으므로, 이를 제거하기 위해 hG-CSF의 1번째 아미노산인 트레오닌 앞에 제한효소 Nde I 인지서열인 5'-CATATG-3'을, 또한 종료코돈 뒷부분에는 제한효소 BamH I 인지서열인 5'-GGATCC-3'를 삽입시키기 위한 서열 번호: 3 및 4의 올리고 뉴클레오타이드 프라이머들 및 주형으로서 플라스미드 pUC19-G-CSF를 이용한 PCR법에 의해 hG-CSF 유전자 단편을 제조하였다. 그 후 증폭된 유전자 단편을 제한효소 Nde I과 BamH I으로 절단하여 hG-CSF 유전자를 포함한 삽입체를 얻었다. 또한 시판되고 있는 플라스미드 pET-14b(노바젠사)를 Nde I과 BamH I으로 절단하고 NdeI/BamHI 부위 사이로 상기 삽입체 DNA 단편을 삽입함으로써 hG-CSF의 분비서열이 제거된 hG-CSF 유전자를 함유한 플라스미드 pT-CSF를 제작하였다.

상기 제작 과정은 도 2에 도시되어 있다.

<44> 실시예 2

<45> (a) 엔테로톡신 분비서열 및 hG-CSF 변이체 유전자를 함유한 벡터의 제작

<46> 엔테로톡신 분비서열의 ATG 개시코돈 앞에 제한효소 Nco I 과 상보적인 제한효소 BspH I 인지서열을 추가하고 3'-말단 위치에는 아미노산의 변화없이 코돈만을 변화시켜 제한효소 Mlu I 인식부위를 갖도록 제조한 서열 번호: 5 및 6의 합성 올리고뉴클레오타이드들을 이용하여 엔테로톡신 분비서열을 함유한 DNA 단편을 제조하였다. 이 DNA 단편을 플라스미드 pUC19의 Sma I 부위로 삽입하여 엔테로톡신 분비서열의 아미노 말단에 제한효소 BspH I 인지부위가 존재하며, 카르복실기 말단에 제한효소 Mlu I 인지부위를 갖는 플라스미드 pUC19ST를 제작하였다.

<47> 또한, 엔테로톡신 분비서열과 hG-CSF 변이체의 유전자를 연결하기 위해서, hG-CSF 유전자를 함유한 실시예 1의 플라스미드 pT-CSF를 주형으로하고, hG-CSF의 1번 아미노산을 트레오닌에서 세린으로 치환하고 종료코돈 뒤에 제한효소 BamH I 인지서열인 5'-GGATCC-3'를 삽입시키도록 디자인된 서열번호: 7 및 8의 올리고뉴클레오타이드 프라이머들을 사용하여 PCR법에 의해 hG-CSF 변이체[Ser¹] hG-CSF를 코딩하는 서열을 함유한 DNA 단편을 얻은 후 이를 제한효소 Mlu I과 BamH I으로 절단하여 Mlu I와 BamH I 말단을 가진 hG-CSF DNA 단편을 제조하였다. 한편, 엔테로톡

신 분비서열을 함유한 플라스미드 pUC19ST를 제한효소 Mlu I 으로 절단한 후 제한효소 BamH I으로 소화하여 Mlu I과 BamH I 말단을 가진 벡터 단편을 얻었다. 이 벡터 단편을 상기의 hG-CSF DNA 단편과 연결하여 플라스미드 pUC19S1SG를 제작하였다.

<48> 플라스미드 pUC19S1SG를 다시 제한효소 BspH I과 BamH I으로 절단하여 DNA 단편

(522 bp)을 회수하고, 노바젠사(Novagen)로부터 구입한 플라스미드 pET14b를 Nco I과 BamH I으로 절단하여 벡터 단편을 만든 후, 상기 DNA 단편과 벡터 단편을 서로 연결시켜 플라스미드 pT14S1SG를 제작하였다. 상기 제작과정은 도 3에 상세히 도시되어 있다.

<49> 또한, 플라스미드 pT14S1SG를 주형으로하고 서열번호: 9 및 10의 합성 올리고뉴클레오타이드를 이용한 PCR법에 의해 엔테로톡신의 샤인-달가르노 서열(Shine-Dalgarno sequence)을 가지며 엔테로톡신 분비서열에 연결된 hG-CSF 변이체 유전자를 함유한 DNA 단편을 얻은 후, 이를 Xba I과 BamH I으로 절단하여 삽입체를 획득하였다. 한편, 플라스미드 pET14b(Novagen사)를 Xba I 과 BamH I으로 절단한 벡터 단편과 상기의 삽입체를 연결시켜 플라스미드 pT14SS1SG를 제작하였다. 상기 제작 과정은 도 4에 도시되어 있다

<50> 이어서, 대장균 BL21(DE3) 균주를 70 mM 염화칼슘 용액으로 처리하여 컴피턴트 대장균으로 만들고, 10 mM 트리스 완충액(pH 7.5) 중 플라스미드 pT14SS1SG의 현탁액을 가하였다. 플라스미드에 의해 전달된 항생물질에 대한 내성 및 감수성을 이용하여 통상적인 방법으로 형질전환주를 선택함으로써 대장균 형질전환주 HM 10310을 수득하였다.

<51> (b) hG-CSF 발현벡터의 제조

<52> 공지된 방법인 특정부위 치환법(site directed mutagenesis 방법)을 이용하여 플라

스미드 pT14SS1SG에 포함된 hG-CSF 변이체 유전자의 1번 위치의 세린 코돈을 트레오닌 코돈으로 바꾸어 줌으로써 hG-CSF 유전자를 가진 발현벡터를 제조하였다. 주형으로 플라스미드 pT14SS1SG를 이용하고, 변형된 코돈을 함유하는 하기 서열번호: 12 및 13의 합성 올리고뉴클레오타이드와 잡종분자를 형성시키며 이 올리고뉴클레오타이드를 지나서 5' → 3' 방향으로 연장시키는 pfu(스트라타진사)와 4개의 뉴클레오타이드 트리포스페이트들(ATP, GTP, TTP, CTP)을 사용하여 유전자 증폭을 수행하였다:

<53> 엔테로톡신 분비서열

과립구 콜로니 자극인자

<54> -5 -4 -3 -2 -1 +1 +2 +3 +4 +5

<55> Thr Asn Ala Tyr Ala Thr Pro Leu Gly Pro (서열번호: 11)

<56> - ACA - AAT - GCC - TAC- GCG - ACA - CCC - CTG - GGC - CCT (서열번호: 12)

<57> - TGT - TTA - CGG - ATG- CGC - TGT - GGG - GAC - CCG - GGA (서열번호: 13)

<58> 증폭된 유전자를 회수하고 제한효소 Dpn I을 첨가하여 증폭전에 넣어 준 기존의 플라스미드를 완전히 제거하였다.

<59> 상기와 같이 수득한 변형체 플라스미드를 대장균 XL-1 blue(노바젠사)에 형질전환시킨 후, 형질전환된 콜로니로부터 DNA를 회수하고, 염기서열을 결정하여 hG-CSF의 1번 아미노산이 세린에서 트레오닌으로 바뀌어진 플라스미드 pT14SSG를 수득하였다.

<60> 이어서, 상기 플라스미드 pT14SSG를 이용하여 상기 (a)에서와 같은 방법으로 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10301을 수득하였다. 이 형질전환주를 배양하여 천연형과 동일한 아미노산 서열을 가진 hG-CSF 단백질의 발현을 확인하였다.

<61> (c) 엔테로톡신 변형체 분비서열을 함유한 벡터의 제작

<62> 엔테로톡신 분비서열 펩타이드 내의 특정 아미노산 잔기만을 변형시키기 위해 공지된 방법인 특정부위 치환법(site directed mutagenesis 방법)을 이용하여 엔테로톡신 변형체 분비서열을 가진 발현벡터를 다음과 같이 제조하였다.

<63> 우선, 엔테로톡신 분비서열 펩타이드의 4번째 아미노산을 Thr으로 치환하기 위하여, 상기 (b)에서 제조된 플라스미드 pT14SSG 및 서열 번호: 15 및 16의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 (b)에서와 같은 특정부위 치환법에 의해 변형된 플라스미드를 제조하였다.

<64> Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu (서열번호: 14)

<65> 5'-GG-TGT-TTT-ATG-AAA-AAG-ACA-ATC-GCA-TTT-CTT-C-3' (서열번호: 15)

<66> 3'-CC-ACA-AAA-TAC-TTT-TTC-TGT-TAG-CGT-AAA-GAA-G-5' (서열번호: 16)

<67> 상기와 같이 수득한 변형체 플라스미드로 대장균 XL-1 blue를 형질전환시킨 후 DNA를 회수하고 염기서열을 결정하여 엔테로톡신 분비서열의 4번째 아미노산이 Thr로 변형된 플라스미드를 수득하였다. 이 플라스미드를 Xba I과 Mlu I으로 절단하여 변형된 엔테로톡신 분비서열 삽입체를 획득하였다. 이어서, 플라스미드 pT14SSG를 Xba I과 Mlu I으로 절단한 벡터 단편과 상기의 삽입체를 연결시켜 플라스미드 pT14SSG-4T를 제작하였다.

<68> 상기와 같이 변형된 엔테로톡신 분비서열 펩타이드의 22번째 아미노산을 Gln으로 치환하기 위하여, 상기에서 제조된 플라스미드 pT14SSG-4T 및 서열 번호: 18 및 19의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 (b)에서와 같은 특정부위 치환법에 의해 변형된 플라

스미드를 제조하였다.

<69> Asn Ala Gln Ala Thr Pro Leu Gly (서열번호: 17)

<70> 5'-CA-AAT-GCC-CAA-GCG-ACA-CCC-CTG-GGC-3' (서열번호: 18)

<71> 3'-GT-TTA-CCG-GTT-CGC-TGT-GGG-GAC-CCG-5' (서열번호: 19)

<72> 상기와 같이 수득한 변형체 플라스미드를 대장균에 형질전환시킨 후 DNA를 회수하고, 염기서열을 결정하여 엔테로톡신 분비서열의 4번째 아미노산이 Thr으로, 22번째 아미노산이 Gln으로 각각 변형된 플라스미드 pT14SSG-4T22Q를 수득하였다.

<73> 상기와 같이 변형된 엔테로톡신 분비서열 펩타이드의 샤인-달가르노 서열을 서열번호: 71과 같이 변형시키기 위하여, 상기에서 제조된 플라스미드 pT14SSG-4T22Q 및 서열번호: 20 및 21의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 (b)에서와 같은 특정부위 치환법에 의해 변형된 플라스미드를 제조하였다.

<74> 상기와 같이 수득한 변형체 플라스미드를 대장균에 형질전환시킨 후 DNA를 회수하고, 염기서열을 결정하여 엔테로톡신 분비서열의 샤인-달가르노 서열을 변형시킨 플라스미드 pT140SSG-4T22Q를 수득하였다. 플라스미드 pT140SSG-4T22Q의 제작 과정은 도 5에 도시되어 있다.

<75> 이어서, 상기 플라스미드 pT140SSG-4T22Q를 이용하여 상기 (a)에서와 같은 방법으로 대장균 BL21(DE3)를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10302를 수득하였다.

<76> 실시예 3: hG-CSF 변이체 유전자 발현 벡터의 제조

<77> 실시예 2의 (a)에서 제조된 플라스미드 pT14SS1SG에 포함된 hG-CSF 유전자를 대장

균 발현계에 적합하도록 대장균 선호 코돈으로 변화시키고, 또한 17번 위치의 자유상태의 시스테인 잔기를 다이설파이드 결합에 관여하지 못하게 세린 잔기로 코돈을 변화시키기 위해 다음과 같이 실시하였다.

<78> 우선, 대장균 선호 코돈 및 17번 세린 코돈을 갖는 hG-CSF 유전자를 제조하기

위해, S1 올리고머(서열 번호: 22) 및 AS1 올리고머(서열번호: 23)를 DNA 합성기로 합성하였다.

<79> 두 올리고머를 0.5 μ l(50 pmole)씩 취한 후 95℃에서 15분간 반응시키고 세시간 동안 서서히 식혀서 온도를 35℃까지 낮추었다. 이를 에탄올로 침전시킨 후 5 % PAGE 겔에서 전기영동하여 접착 말단을 가진 두 가닥으로 결합된 올리고머를 회수하였다.

<80> 한편, 플라스미드 pT14SS1SG를 제한효소 Apa I과 BstX I으로 절단하여 G-CSF의 4번째 아미노산부터 25번째 아미노산 사이의 유전자를 제거하였다. 수득된 벡터 단편을 상기에서 제조된 두 가닥으로 결합된 올리고머와 연결하여 아미노 말단을 코딩하는 유전자가 대장균 선호코돈을 가지고 있으며 1번과 17번 아미노산이 각각 세린으로 치환된 hG-CSF를 발현하는 플라스미드 pT14SS1S17SEG를 제작하였다. 이의 제작 과정은 도 6에 도시되어 있다.

<81> 상기 플라스미드 pT14SS1S17SEG를 이용하여 실시예 2의 (a)에서와 같은 방법으로 대장균 BL21(DE3)를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10311을 제조하고, 이를 1999년 3월 24일자로 국제기탁기관인 한국 종균협회 부설 한국 미생물 보존 센터(KCCM, 대한민국 서울시 서대문구 신촌동 134 소재)에 기탁번호 제 KCCM-10154 호로 기탁하였다.

<82> 실시예 4: OmpA 분비서열 및 hG-CSF 변이체 유전자를 포함하는 벡터의 제작

<83> Tac 프로모터와 OmpA 분비서열(서열번호: 24)에 연결된 hG-CSF 변이체 유전자를 포함하는 발현 벡터를 다음과 같이 제작하였다.

<84> ~~Met- Lys- Lys- Thr- Ala- Ile- Ala- Ile- Ala- Val- Ala- Leu- Ala- Gly-~~

<85> Phe- Ala- Thr- Val- Ala- Gln- Ala- Ser- Arg- (서열번호: 24)

<86> --- GTT- GCG- CAA- GCT- TCT- CGA --- (서열번호: 25)

<87> --- CAA- CGC- GTT- CGA- AGA- GCT --- (서열번호: 26)

<88> Hind III 절단부위

<89> Tac 프로모터와 OmpA 분비서열을 포함한 플라스미드 pFlag.CTS(이스트만사)를 제한 효소 Hind III와 EcoR I으로 절단하여 접착 말단을 가진 벡터 단편을 제조하였다.

<90> 또한 OmpA 분비서열과 hG-CSF 유전자를 연결하기 위해서, hG-CSF 유전자를 함유한 플라스미드 pT-CSF를 주형으로 하고 hG-CSF의 앞 부분에 Hind III 인지 부위를 삽입하기 위하여 1번째 아미노산을 트레오닌 코돈 대신 세린으로 디자인하여 제조된 서열번호: 27의 올리고머 및 종료코돈 뒤에 제한효소 EcoR I 인지서열인 5'-GAATTC-3'를 삽입하도록 디자인된 서열번호: 28의 올리고머를 이용하여 hG-CSF를 코드하는 배열을 함유한 DNA 단편을 얻은 후, 제한효소 Hind III와 EcoR I으로 절단하여 Hind III와 EcoR I 말단을 가진 hG-CSF DNA 단편을 제조하였다. 이 단편을 상기의 절단된 벡터와 연결하여 플라스미드 pTO1SG를 제작하였다. 플라스미드 pTO1SG의 제작과정 및 OmpA 분비서열과 hG-CSF의 연결 부위의 아미노산 서열(서열번호: 29)이 도 7에 도시되어 있다.

<91> 상기 플라스미드 pTO1SG를 이용하여 실시예 2의 (a)에서와 같은 방법으로 대장균

BL21(DE3)를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10409를 제조하였다.

<92> 실시예 5: OmpA 분비서열과 hG-CSF 유전자를 포함하는 벡터의 제조

<93> ~~플라스미드 pT01SG에 포함된 hG-CSF 유전자의 1번 위치의 세린 코돈을 트레오닌 코~~

돈으로 치환하기 위하여, 상기 실시예 4에서 제조된 플라스미드 pT01SG 및 서열 번호:

30 및 31의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 실시예 2의 (b)에서와 같은 특정부위 치환법에 의해 변형된 플라스미드를 제조하였다.

<94> 상기와 같이 수득한 변형체 플라스미드를 대장균 XL-1 blue에 형질전환시킨 후, 형질전환된 콜로니로부터 DNA를 회수하고, 염기서열을 결정하여 hG-CSF의 1번 아미노산이 세린에서 트레오닌으로 바뀌어진 플라스미드 pTOG를 수득하였다.

<95> 이어서, 상기 플라스미드 pTOG를 이용하여 상기 실시예 2의 (a)에서와 같은 방법으로 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10401을 수득하였다. 이 형질전환주를 배양하여 천연형과 동일한 아미노산 서열을 가진 hG-CSF 단백질의 발현을 확인하였다.

<96> 실시예 6: hG-CSF 변이체의 제조

<97> (a) [Ser¹, Ser¹⁷] hG-CSF의 제조

<98> 플라스미드 pT01SG에 포함된 hG-CSF 유전자 변이체([Ser¹] hG-CSF)의 17번 위치의 시스테인 코돈을 세린 코돈으로 더 치환하기 위하여, 상기 실시예 5에서 제조된 플라스미드 pTOG 및 서열 번호: 32 및 33의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 실시예 2의 (b)

에서와 같은 특정부위 치환법에 의해 변형된 플라스미드를 제조하였다.

<99> 상기와 같이 수득한 변형체 플라스미드를 대장균 XL-1 blue에 형질전환시킨 후, 형질전환된 콜로니로부터 DNA를 회수하고, 염기서열을 결정하여 hG-CSF의 1번 아미노산이 트레오닌에서 세린으로, 17번 아미노산이 시스테인에서 세린으로 각각 치환된 플라스미드 pT01S17SG를 수득하였다.

<100> 이어서, 상기 플라스미드 pT01S17SG를 이용하여 상기 실시예 2의 (a)에서와 같은 방법으로 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10410을 수득하고, 이를 1999년 3월 24일자로 국제기탁기관인 한국 종균협회 부설 한국 미생물 보존 센터(KCCM, 대한민국 서울시 서대문구 신촌동 134 소재)에 기탁번호 제 KCCM-10151 호로 기탁하였다.

<101> (b) [Ser¹⁷] hG-CSF의 제조

<102> 플라스미드 pTOG에 포함된 hG-CSF 유전자의 17번 위치의 시스테인 코돈을 세린 코돈으로 치환하기 위하여, 상기 실시예 5에서 제조된 플라스미드 pTOG 및 서열 번호: 32 및 33의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 실시예 2의 (b)에서와 같은 특정부위 치환법에 의해 변형된 플라스미드를 제조하였다.

<103> 상기와 같이 수득한 변형체 플라스미드를 대장균 XL-1 blue에 형질전환시킨 후, 형질전환된 콜로니로부터 DNA를 회수하고, 염기서열을 결정하여 hG-CSF의 17번 아미노산이 시스테인에서 세린으로 치환된 플라스미드 pT017SG를 수득하였다.

<104> 이어서, 상기 플라스미드 pT017SG를 이용하여 상기 실시예 2의 (a)에서와 같은 방법으로 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10411을 수득하고,

이를 1999년 3월 24일자로 국제기탁기관인 한국 종균협회 부설 한국 미생물 보존 센터 (KCCM, 대한민국 서울시 서대문구 신촌동 134 소재)에 기탁번호 제 KCCM-10152 호로 기탁하였다.

<105> (c) [Thr¹⁷] hG-CSF의 제조

<106> 플라스미드 pTOG에 포함된 hG-CSF 유전자의 17번 위치의 시스테인 코돈을 트레오닌 코돈으로 치환하기 위하여, 상기 실시예 5에서 제조된 플라스미드 pTOG 및 서열 번호: 34 및 35의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 실시예 2의 (b)에서와 같은 특정부위 치환법에 의해 변형된 플라스미드를 제조하였다.

<107> 상기와 같이 수득한 변형체 플라스미드를 대장균 XL-1 blue에 형질전환시킨 후, 형질전환된 콜로니로부터 DNA를 회수하고, 염기서열을 결정하여 hG-CSF의 17번 아미노산이 시스테인에서 트레오닌으로 치환된 플라스미드 pT017TG를 수득하였다.

<108> 이어서, 상기 플라스미드 pT017TG를 이용하여 상기 실시예 2의 (a)에서와 같은 방법으로 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10413을 수득하였다.

<109> (d) [Ala¹⁷] hG-CSF의 제조

<110> 플라스미드 pTOG에 포함된 hG-CSF 유전자의 17번 위치의 시스테인 코돈을 알라닌 코돈으로 치환하기 위하여, 상기 실시예 5에서 제조된 플라스미드 pTOG 및 서열 번호: 36 및 37의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 실시예 2의 (b)에서와 같은 특정부위 치환법에 의해 변형된 플라스미드를 제조하였다.

<111> 상기와 같이 수득한 변형체 플라스미드를 대장균 XL-1 blue에 형질전환시킨 후, 형

질 전환된 콜로니로부터 DNA를 회수하고, 염기서열을 결정하여 hG-CSF의 17번 아미노산이 시스테인에서 알라닌으로 치환된 플라스미드 pTO17AG를 획득하였다.

<112> 이어서, 상기 플라스미드 pTO17AG를 이용하여 상기 실시예 2의 (a)에서와 같은 방법으로 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10414를 획득하였다.

<113> (e) [Gly¹⁷] hG-CSF의 제조

<114> 플라스미드 pTOG에 포함된 hG-CSF 유전자의 17번 위치의 시스테인 코돈을 글라이신 코돈으로 치환하기 위하여, 상기 실시예 5에서 제조된 플라스미드 pTOG 및 서열 번호: 38 및 39의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 실시예 2의 (b)에서와 같은 특정부위 치환법에 의해 변형된 플라스미드를 제조하였다.

<115> 상기와 같이 획득한 변형체 플라스미드를 대장균 XL-1 blue에 형질전환시킨 후, 형질 전환된 콜로니로부터 DNA를 회수하고, 염기서열을 결정하여 hG-CSF의 17번 아미노산이 시스테인에서 글라이신으로 치환된 플라스미드 pTO17GG를 획득하였다.

<116> 이어서, 상기 플라스미드 pTO17GG를 이용하여 상기 실시예 2의 (a)에서와 같은 방법으로 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10415를 획득하였다.

<117> (f) [Asp¹⁷] hG-CSF의 제조

<118> 플라스미드 pTOG에 포함된 hG-CSF 유전자의 17번 위치의 시스테인 코돈을 아스파틱 산 코돈으로 치환하기 위하여, 상기 실시예 5에서 제조된 플라스미드 pTOG 및 서열

<119> 상기와 같이 수득한 변형체 플라스미드를 대장균 XL-1 blue에 형질전환시킨 후, 형
질전환된 콜로니로부터 DNA를 회수하고, 염기서열을 결정하여 hG-CSF의 17번 아미노산이

<120> 이어서, 상기 플라스미드 pT017APG를 이용하여 상기 실시예 2의 (a)에서와 같은 방법으로 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10416을 수득하였다.

<122> (a) 아라비노스 프로모터 및 Gene III 분비서열을 함유한 벡터의 제작

<123> 아라비노스 프로모터와 하기의 Gene III 분비서열(서열번호: 42)에 연결된 hG-CSF 유전자를 포함하는 발현 벡터를 다음과 같이 제작하였다.

<124> Met - Lys - Lys - Leu - Leu - Phe - Ala - Ile - Pro - Leu - Val - Val - Pro - Phe
- Tyr - Ser - His - Ser - (서열번호: 42)

<125> - TAT - AGC - CAT - AGC - ACC - ATG - GAG - (서열번호: 43)

<126> - ATA - TCG - GTA - TCG - TGG - TAC - CTC - (서열번호: 44)

<127> Nco I 절단부위

<128> 아라비노스 프로모터와 Gene III 분비서열을 포함하는 플라스미드 pBAD·gIIIA를 제

한효소 Nco I으로 절단한 후 싱글 스트랜드 DNA를 클레나우 DNA 폴리머레이즈로 제거하여 평활 말단으로 만든 후, 다시 Bgl II로 절단하여 평활 말단과 접착 말단을 가진 벡터 단편을 제조하였다.

<129> 한편, hG-CSF 유전자 삽입체를 제조하기 위하여, 플라스미드 pT-CSF를 주형으로 하

고, hG-CSF의 2번 내지 10번 아미노산 서열(서열번호: 45)에 대응하는 서열번호: 46 및 47의 합성 올리고뉴클레오타이드들을 이용한 PCR에 의해 아미노 말단을 평활 말단으로 만들고 카르복시 말단에 BamH I 인지부위를 갖는 hG-CSF를 함유한 DNA 단편을 획득한 후, 제한효소 BamH I으로 절단하여 평활 말단과 접착 말단을 가진 hG-CSF 유전자를 회수하였다.

<130> Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu (서열번호: 45)

<131> 5'- C - CCC - CTG - GGC - CCT - GCC - AGC - TCC - CTG -3' (서열번호: 46)

<132> 3'- G - GGG - GAC - CCG - GGA - CGG - TCG - AGG - GAC -5' (서열번호: 47)

<133> 상기의 벡터 단편과 hG-CSF 유전자를 가진 삽입체를 결합시켜 아라비노스 프로모터와 Gene III 분비서열을 가진 플라스미드 pBADG를 완성하였다. 플라스미드 pBADG의 제작과정 및 Gene III 분비서열과 hG-CSF의 연결 부위의 아미노산 서열(서열번호: 48)이 도 8에 도시되어 있다.

<134> 상기와 같이 수득한 플라스미드로 대장균 XL-1 blue를 형질전환시킨 후, 형질전환된 콜로니로부터 DNA를 회수하고, 염기서열을 결정하였다. 이 플라스미드 pBADG를 이용하여 상기 실시예 2의 (a)에서와 같은 방법으로 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10501을 수득하였다. 이 형질전환주를 배양하여 천연형과 동일한

아미노산 서열을 가진 hG-CSF 단백질의 발현을 확인하였다.

<135> (b) [Met², Val³] hG-CSF의 제조

~~<136> 플라스미드 pBAD-gIII A(인비트로젠사)를 제한효소 Nco I과 Bgl II로 절단하여 양~~

쪽 모두 접착 말단을 가진 벡터 단편을 제조하였다.

<137> Met - Lys - Lys - Leu - Leu - Phe - Ala - Ile - Pro - Leu - Val - Val - Pro - Phe

- Tyr - Ser - His - Ser -

(서열번호: 42)

<138> - TAT - AGC - CAT - AGC - ACC - ATG - GAG - (서열번호: 43)

<139> - ATA - TCG - GTA - TCG - TGG - TAC - CTC - (서열번호: 44)

<140> Nco I 절단부위

<141> 한편, hG-CSF 유전자 삽입체를 제조하기 위하여, 플라스미드 pT-CSF를 주형으로 하

고 서열번호: 50 및 51의 합성 올리고뉴클레오타이드들을 이용한 PCR에 의해 아미노 말

단을 평활 말단으로 만들고 카르복시 말단에 BamH I 인지부위를 갖는 hG-CSF를 함유한

DNA 단편을 획득한 후, 제한효소 Nco I과 BamH I으로 절단하여 양쪽 모두 접착 말단인

상태로 회수하였다.

<142> Thr Met Val Gly Pro Ala Ser Ser Leu (서열번호: 49)

<143> 5'- TAC- GCG- TCC- ATG- GTG- GGC- CCT- GCC- AGC- TCC- CTG-3' (서열번호: 50)

<144> 3'- ATG- CGC- AGG- TAC- CAC- CCG- GGA- CGG- TCG- AGG- GAC-5' (서열번호: 51)

<145> Nco I 인식 부위

<146> 상기의 벡터 단편과 hG-CSF 유전자를 가진 삽입체를 결합시켜 2번째와 3번째 아미

노산이 각각 메티오닌과 발린으로 변형된 hG-CSF의 유전자를 가진 플라스미드 pBAD2M3VG를 제작하였다. 이 플라스미드의 제작과정 및 Gene III 분비서열과 hG-CSF의 연결부위의 아미노산 서열(서열번호: 52)이 도 9에 도시되어 있다.

<147> 상기 플라스미드 pBAD2M3VG를 이용하여 상기 실시예 2의 (a)에서와 같은 방법으로

대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10510을 수득하고, 이를 1999년 3월 24일자로 국제기탁기관인 한국 중균협회 부설 한국 미생물 보존 센터(KCCM, 대한민국 서울시 서대문구 신촌동 134 소재)에 기탁번호 제 KCCM-10153 호로 기탁하였다

<148> (c) [Ser¹⁷] 인간 과립구 자극 인자의 제조

<149> 아라비노스 프로모터 시스템에서 hG-CSF 유전자의 17번 위치의 시스테인 코돈을 세린 코돈으로 치환하기 위하여, 상기 (a)에서 제조된 플라스미드 pBADG 및 서열 번호: 32 및 33의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 실시예 2의 (b)에서와 같은 특정부위 치환법에 의해 변형된 플라스미드를 제조하였다.

<150> 상기와 같이 수득한 변형체 플라스미드를 대장균 XL-1 blue에 형질전환시킨 후, 형질전환된 콜로니로부터 DNA를 회수하고, 염기서열을 결정하여 hG-CSF의 17번째 아미노산이 시스테인에서 세린으로 치환된 플라스미드 pBAD17SG를 수득하였다.

<151> 이어서, 상기 플라스미드 pBAD17SG를 이용하여 상기 실시예 2의 (a)에서와 같은 방법으로 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10511을 수득하였다.

<152> (d) [Met², Val³, Ser¹⁷] 인간 과립구 자극 인자의 제조

<153> 아라비노스 프로모터 시스템에서 hG-CSF 유전자의 2번 프롤린, 3번 로이신 및 17번 시스테인 코돈들을 각각 메티오닌, 발린 및 세린 코돈으로 치환하기 위하여, 상기 (b)

에서 제조된 플라스미드 pBAD2M3VG 및 서열 번호: 32 및 33의 올리고뉴클레오타이드를

이용하여 실시예 2의 (b)에서와 같은 특정부위 치환법에 의해 변형된 플라스미드를 제조하였다.

<154> 상기와 같이 수득한 변형체 플라스미드를 대장균 XL-1 blue에 형질전환시킨 후, 형질전환된 콜로니로부터 DNA를 회수하고, 염기서열을 결정하여 hG-CSF의 2번, 3번 및 17번 아미노산이 각각 메티오닌, 발린 및 세린으로 치환된 플라스미드 pBAD2M3V17SG를 수득하였다.

<155> 이어서, 상기 플라스미드 pBAD2M3V17SG를 이용하여 상기 실시예 2의 (a)에서와 같은 방법으로 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켜 대장균 형질전환주 HM 10512를 수득하였다.

<156> 실시예 8. hG-CSF의 발현량 비교

<157> 상기 실시예 2 내지 7에서 수득한 대장균 형질전환체들을 각각 LB 배지에서 배양한 후 적절한 유도제(예: IPTG)를 가하여 3시간 동안 항온처리하거나, 또는 유도제를 가하지 않고 15시간 이상 충분히 배양하였다. 배양액을 원심분리 또는 여과한 후, 세포덩어리를 삼투압 쇼크법(Nossal, G. N., *J. Biol. Chem.*, 241, 3055(1966))에 의해 다음과 같이 처리하였다. 즉, 배양액을 6000 rpm에서 20분간 원심분리함으로써 균체를 침전구

획분에 회수하고, 원래 배양액량의 10분의 1량의 등장액(20 % 슈크로스, 1 mM EDTA를 함유한 10mM 트리스-염산 완충액(pH 7.0))에 현탁하였다. 이 현탁액을 30분간 방치한 후, 원심분리해서 균체를 회수하였다. 다음에, 회수된 균체를 4℃의 냉수에 현탁함으로써 균체의 페리플라즘 속에 존재하는 단백질을 추출하였다. 현탁액을 원심분리해서 균체 성분을 제거하고, 상청을 페리플라즘 구획분으로서 회수하였다. 페리플라즘 구획분에 회수된 hG-CSF의 농도를 hG-CSF에 대한 항체(알앤드디사)를 사용한 통상의 효소면역측정법에 따라 측정하고, 그 측정치로부터 배양배지 1L 당의 hG-CSF 분비량을 환산하여 표 1에 나타내었다.

<158> 【표 1】

hG-CSF 및 변이체의 발현량 비교

발현숙주	실시예	발현벡터	CSF 내의 아미노산 변형 잔기	페리플라즘내 CSF 생산량 (hG-CSF mg/L)
HM 10301	2(b)	pT14SSG		65
HM 10302	2(c)	pT140SSG-4T22Q		277
HM 10310	2(a)	pT14SS1SG	Ser ¹	92
HM 10311	3	pT14SS1S17SEG	Ser ¹ , Ser ¹⁷	1,512
HM 10401	5	pTOG		85
HM 10409	4	pTO1SG	Ser ¹	105
HM 10410	6(a)	pTO1S17SG	Ser ¹ , Ser ¹⁷	1,477
HM 10411	6(b)	pTO17SG	Ser ¹⁷	1,550
HM 10413	6(c)	pTO17TG	Thr ¹⁷	1,373
HM 10414	6(d)	pTO17AG	Ala ¹⁷	1,486
HM 10415	6(e)	pTO17GG	Gly ¹⁷	1,480
HM 10416	6(f)	pTO17APG	Asp ¹⁷	67
HM 10501	7(a)	pBADG		54
HM 10510	7(b)	pBAD2M3VG	Met ² , Val ³	69
HM 10511	7(c)	pBAD17SG	Ser ¹⁷	937
HM 10512	7(d)	pBAD2M3V17SG	Met ² , Val ³ , Ser ¹⁷	983

<159> 실시예 9: 후처리 및 정제

<160> 실시예 8에서와 같은 방법으로 본 발명의 대장균 형질전환체들 중 대장균 형질전환주 HM 10411을 배양한 후 배양액을 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포를 수확하고 삼투압 쇼크법에 의해 페리플라즘 분획을 수확하였다.

<161> 이 후 차례로 컬럼을 이용하여 정제를 실시하였다. 이때는 이온교환수지, 흡착 및 겔 여과 컬럼 또는 항체 컬럼이 적절하다. 먼저 수확된 페리플라즘 분획을 pH 5.0 ~ 5.5로 조정 한 후 pH 5.3으로 미리 평형화된 CM-세파로즈(CM-Separose; 파마시아사) 컬럼에 결합시키고 25 mM NaCl 용액으로 충분히 세척하였다. 그 후 50 mM, 100 mM, 200 mM NaCl 용액이 포함된 완충용액으로 활성을 가진 분획을 수확하였다. 그 후 페닐 세파로즈(Phenyl Separose; 파마시아사) 컬럼을 통과시켜 99% 이상의 순도를 가진 [Ser¹⁷] hG-CSF를 정제하였다. 또한, 대장균 형질전환주 HM 10311, HM 10409, HM 10410, HM 10413, HM 10414, HM 10415, HM 10510 및 HM 10512를 이용하여 동일한 실험을 반복하여 다른 변형체들을 정제하였다. 정제된 변이체들의 농도 및 순도는 나트륨 도데실 설페이트/아크릴아마이드 겔 또는 HPLC를 사용하여 분석함으로써 검사하고 농도는 실시예 8에서와 같은 통상의 효소면역 측정법을 이용하여 분석하였다. 또한 아미노 말단 서열 20개를 분석한 결과 메티오닌 없이 정상적인 서열로 확인되었으며, 변이체들 또한 아미노 말단으로부터 1, 2, 3번째 또는 17번째 아미노산이 정확한 위치에서 치환된 형태로 발현되었음을 확인할 수 있었다. 치환체들의 N-말단 20개 아미노산의 서열은 서열번호: 63 내지 70과 같았다.

<162> 실시예 10: 재조합 균주로부터 생성된 단백질의 분자량 비교

<163> SDS-PAGE 및 웨스턴 블라팅을 이용하여 재조합 균주로부터 hG-CSF 변이체의 발현여부와 분자량을 확인하였다.

<164> 우선, 실시예 9에서 얻은 대장균 형질전환주 HM 10411의 페리플라즘 분획 및 정제된 [Ser¹⁷] hG-CSF를 Met-hG-CSF(입수처: 기린-암젠사)를 대조군으로하여 통상의 방법에

따라 SDS-PAGE로 분석하였다. 이 결과는 도 10a에 나타나 있고, 여기에서 레인 1은 Met-G-CSF 대조군이고, 레인 2는 대장균 형질전환주 HM 10411의 페리플라즘 분획이며, 레인 3은 정제된 [Ser¹⁷] hG-CSF이다. 이로부터 [Ser¹⁷] hG-CSF가 천연형 hG-CSF와 동일한 분자량을 갖고, 대장균 형질전환주 HM 10411의 페리플라즘 분획에 대량으로 포함되어 있음을 확인하였다.

<165> 나이트로셀룰로스 막(바이오래드사, 미국)을 블라팅용 완충액(170 mM 글리신(glycine), 25 mM Tris·HCl(pH 8), 20 % 메탄올)에 충분히 적셔준 후 상기에서 SDS-PAGE된 겔을 이용하여 블라팅 키트로 3시간 가량 블라팅을 수행하였다. 그 후 나이트로셀룰로스 막을 1 % 카제인 용액에 1시간동안 방치하고 0.05% 트윈 20을 포함하는 PBST 용액으로 3회 세척하였다. 세척 후 염소 항-G-CSF 항체(R&D System사, AB-214-NA, 미국)를 PBS로 희석하여 가한 후 상온에서 2시간 동안 반응 시켰다. 반응이 완결된 후 PBST 용액으로 3회 세척하여 반응하지 않은 항체를 제거하였다. 여기에 HRP(horseradish peroxidase)-콘쥬게이트된 토끼 항-염소 IgG(바이오래드사, 미국) 용액을 PBS에 희석하여 가한 후 상온에서 2시간 동안 더 반응시켰다. 그 후 PBST로 세척하고 퍼옥시다아제 기질 키트(바이오래드사, 미국) 용액을 가하여 발색시켰다. 그 결과는 도 10b에 나타나 있으며, 여기에서 레인 1은 Met-G-CSF 대조군이고, 레인 2는 정제된 [Ser¹⁷] hG-CSF이다

<166> 본 실시예의 결과로부터, 본 발명의 재조합 대장균 균주로부터 hG-CSF 변이체들이 대량 발현되고 이들이 천연형의 hG-CSF와 동일한 분자량을 가짐을 확인할 수 있었다

<167> 실시예 11: hG-CSF 및 변이체의 세포내 활성 측정

<168> 인간 골수 기원의 세포주인 HL-60(ATCC CCL-240, Promyelocytic leukemia 환자/36

세 백인 여성)을 10 %의 소태아혈청을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양하다가, 세포의 숫자를 약 2.2×10^5 세포/ml이 되도록 조정 한 후, DMSO(dimethylsulfoxide, culture grade/SIGMA)를 최종 농도 1.25 % (v/v)가 되도록 가하였다. 위의 세포주를 96 웰 플레이트(Corning/low evaporation 96 well plate)에 90 μ l 씩 넣어서 웰당 세포가 약 2×10^4 개가 되도록 한 후, 5 % 이산화탄소가 공급되는 37 °C 배양기에서 약 48 시간 동안 배양하였다.

<169> 농도가 결정된 hG-CSF 변이체들과, 현재 시판되고 있는 제일약품의 hG-CSF(대장균 세포발현물, Kilin 수입품)를 각각 최종 농도가 500 ng/ml이 되도록 RPMI 1640 배지로 희석한 후, 이로부터 RPMI 1640 배지를 이용하여 2배 연속 희석을 10회씩 더 실시하였다

<170> 이렇게 만들어진 시료를 배양 중인 HL-60 세포주의 각 웰에 10 μ l씩 가하여, 최종 농도가 50 ng/ml부터 연속적으로 반감되도록 하였다. hG-CSF 및 그의 변이체들을 처리한 세포주를 37 °C 배양기에서 48 시간 동안 더 배양하였다.

<171> 배양후 세포주의 증가 정도를 알아보기 위하여, 상업적으로 시판되고 있는 프로메가사의 CellTiter96™(cat # G4100)을 이용하여, 증가한 세포주의 숫자를 670 nm파장에서 흡광도로 결정하여 분석을 완료하였다.

<172> 분석 결과, 도 11에서 볼 수 있는 바와 같이 동일한 농도로 희석된 hG-CSF 변이체들은 현재 상업적으로 유통되고 있는 hG-CSF와 동일한 활성을 지니고 있음을 알 수 있으며, 특히 천연형과 [Thr¹⁷] hG-CSF의 경우는 활성이 거의 같은 것으로 나타났고, [Ser¹⁷] hG-CSF와 [Gly¹⁷] hG-CSF는 천연형보다 더 높은 활성을 가지는 것으로 나타났다. 따라서, 본 실시예에서는 본 발명의 hG-CSF 변이체들이 천연형 hG-CSF에 비해 동등 이상의 생물학적 활성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

【발명의 효과】

<173> 본 발명의 hG-CSF 변이체들은 발현 효율이 우수할 뿐만 아니라 분비서열과 연결하여 발현시킬 경우 우수한 분비율을 나타낸다. 또한, 본 발명의 방법에 따라 hG-CSF 또는 그의 변이체를 분비서열에 연결하여 발현시키면 아미노 말단에 추가의 메티오닌이 첨가되지 않은 hG-CSF 또는 그의 변이체를 페리플라즘으로 분비시켜 대량으로 생산할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 천연형 인간 과립구 콜로니 자극인자(hG-CSF)의 1, 2, 3 및 17번째 아미노산 중 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 hG-CSF 변이체.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

하기 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 hG-CSF 변이체:

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 1번 트레오닌 및 17번 시스테인이 다른 아미노산으로 각각 치환된 것,

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 2번 프로린 및 3번 로이신이 다른 아미노산으로 각각 치환된 것,

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 2번 프로린, 3번 로이신 및 17번 시스테인이 다른 아미노산으로 각각 치환된 것, 및

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 17번 시스테인이 다른 아미노산으로 치환된 것.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서,

하기 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 hG-CSF 변이체:

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 1번 트레오닌 및 17번 시스테인이 각각 세린으로 치환된 것,

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 2번 프롤린이 메티오닌으로, 3번 로이신이 발린으로 각각 치환된 것,

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 2번 프롤린이 메티오닌으로, 3번 로이신이 발린으로, 17번 시스테인이 세린으로 각각 치환된 것, 및

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 17번 시스테인이 세린, 트레오닌, 알라닌 또는 글라이신으로 치환된 것.

【청구항 4】

제 1 항의 hG-CSF 변이체를 코드하는 DNA.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서,

hG-CSF 변이체를 코드하는 DNA의 제1번 내지 제60번 염기의 서열이 서열번호: 63 내지 서열번호: 70으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 제61번 염기 이후의 서열은 천연형 hG-CSF를 코드하는 DNA와 동일한 것임을 특징으로 하는 DNA.

【청구항 6】

제 4 항의 DNA를 포함하는 hG-CSF 변이체 발현 벡터.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서,

분비서열을 추가로 포함하는 hG-CSF 변이체 발현 벡터.

【청구항 8】

제 6 항에 있어서,

플라스미드 pT14SS1SG, pT14SS1S17SEG, pTO1SG, pTO1S17SG, pTO17SG, pTO17TG, pTO17AG, pTO17GG, pBAD2M3VG, pBAD17SG 또는 pBAD2M3V17SG인 hG-CSF 변이체 발현 벡터.

【청구항 9】

제 6 항의 hG-CSF 변이체 발현 벡터로 형질전환된 미생물.

【청구항 10】

제 9 항에 있어서, 대장균임을 특징으로 하는 미생물.

【청구항 11】

제 10 항에 있어서,

대장균 BL21(DE3)/pT14SS1SG(HM 10310), 대장균 BL21(DE3)/pT14SS1S17SEG(HM 10311; 기탁번호: KCCM-10154), 대장균 BL21(DE3)/pTO1SG(HM 10409), 대장균 BL21(DE3)/pTO1S17SG(HM 10410; 기탁번호: KCCM-10151), 대장균 BL21(DE3)/pTO17SG(HM 10411; 기탁번호: KCCM-10152), 대장균 BL21(DE3)/pTO17TG(HM 10413), 대장균 BL21(DE3)/pTO17AG(HM 10414), 대장균 BL21(DE3)/pTO17GG(HM 10415), 대장균 BL21(DE3)/pBAD2M3VG(HM 10510; 기탁번호: KCCM-10153), 대장균 BL21(DE3)/pBAD17SG(HM 10511) 또는 대장균 BL21(DE3)/pBAD2M3V17SG(HM 10512)인 형질전환된 대장균.

【청구항 12】

인간 과립구 콜로니 자극인자(hG-CSF) 또는 그의 변이체를 코딩하는 유전자 및 그의 5'-

말단에 연결된 분비서열 유전자를 포함하는 발현 벡터로 대장균을 형질전환시키고, 형질 전환된 대장균을 적절한 조건하에 배양함으로써 아미노 말단에 추가의 메티오닌이 첨가되지 않은 hG-CSF 변이체를 대장균 페리플라즘 내로 분비 생산하는 방법.

【청구항 13】

제 12 항에 있어서,

hG-CSF 변이체가 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 천연형 hG-CSF의 1, 2, 3 및 17번째 아미노산 중 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것임을 특징으로 하는 방법.

【청구항 14】

제 12 항에 있어서,

hG-CSF 변이체가 하기 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 방법:

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 1번 트레오닌 및 17번 시스테인이 다른 아미노산으로 각각 치환된 것,

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 2번 프로린 및 3번 로이신이 다른 아미노산으로 각각 치환된 것,

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 2번 프로린, 3번 로이신 및 17번 시스테인이 다른 아미노산으로 각각 치환된 것, 및

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 17번 시스테인이 다른 아미노산으로 치환된 것.

【청구항 15】

제 12 항에 있어서,

hG-CSF 변이체가 하기 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 방법:

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 1번 트레오닌 및 17번 시스테인이 각각 세린으로 치

환된 것,

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 2번 프롤린이 메티오닌으로, 3번 로이신이 발린으로
각각 치환된 것,

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 2번 프로린이 메티오닌으로, 3번 로이신이 발린으로
, 17번 시스테인이 세린으로 각각 치환된 것, 및

천연형 hG-CSF의 아미노산 서열 중 17번 시스테인이 세린, 트레오닌, 알라닌 또는 글라
이신으로 치환된 것.

【청구항 16】

제 12 항에 있어서,

hG-CSF 변이체를 코드하는 유전자가 제1번 내지 제60번 염기의 서열이 서열번호: 63 내
지 서열번호: 70으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 제61번 염기 이후의 서열은 천연
형 hG-CSF를 코드하는 유전자와 동일한 것임을 특징으로 하는 방법.

【청구항 17】

제 12 항에 있어서,

분비서열로 대장균 유래 열안정성 엔테로톡신 분비서열 또는 그의 변형체를 이용하는 것
을 특징으로 하는 방법.

【청구항 18】

제 17 항에 있어서,

서열번호: 53의 분비서열을 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 19】

제 17 항에 있어서,

서열번호: 54의 분비서열을 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 20】

제 17 항에 있어서,

대장균 유래 열안정성 엔테로톡신 분비서열의 변형체의 샤인-달가르노 서열이 서열번호:

71의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법

【청구항 21】

제 12 항에 있어서,

분비서열로 대장균 유래 베타 락타마제 분비서열 또는 그의 변형체를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 22】

제 21 항에 있어서,

서열번호: 24의 분비서열을 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 23】

제 12 항에 있어서,

분비서열로 대장균 유래 Gene III 분비서열 또는 그의 변형체를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 24】

제 23 항에 있어서,

서열번호: 42의 분비서열을 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 25】

제 12 항에 있어서,

형질전환된 대장균이 대장균 BL21(DE3)/pT14SS1SG(HM 10310), 대장균

BL21(DE3)/pT14SS1S17SEG(HM 10311; 기탁번호: KCCM-10154), 대장균

BL21(DE3)/pT01SG(HM 10409), 대장균 BL21(DE3)/pT01S17SG(HM 10410; 기탁번호:

KCCM-10151), 대장균 BL21(DE3)/pT017SG(HM 10411; 기탁번호: KCCM-10152), 대장균

BL21(DE3)/pT017TG(HM 10413), 대장균 BL21(DE3)/pT017AG(HM 10414), 대장균

BL21(DE3)/pT017GG(HM 10415), 대장균 BL21(DE3)/pBAD2M3VG(HM 10510; 기탁번호:

KCCM-10153), 대장균 BL21(DE3)/pBAD17SG(HM 10511) 또는 대장균

BL21(DE3)/pBAD2M3V17SG(HM 10512)인 방법.

【도면】

【도 1】

T P L G P A S S L P Q S F L L K
aca ccc ctg ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag

C L E Q V R K I Q G D G A A L Q
tgc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag

E K L C A T Y K L C H P E E L V
gag aag ctg tgt gcc acc tac aag ctg tgc cac ccc gag gag ctg gtg

L L G H S L G I P W A P L S S C
ctg ctc gga cac tct ctg ggc atc ccc tgg gct ccc ctg agc tcc tgc

P S Q A L Q L A G C L S Q L H S
ccc agc cag gcc ctg cag ctg gca ggc tgc ttg agc caa ctc cat agc

G L F L Y Q G L L Q A L E G I S
ggc ctt ttc ctc tac cag ggg ctc ctg cag gcc ctg gaa ggg ata tcc

P E L G P T L D T L Q L D V A D
ccc gag ttg ggt ccc acc ttg gac aca ctg cag ctg gac gtc gcc gac

F A T T I W Q Q M E E L G M A P
ttt gcc acc acc atc tgg cag cag atg gaa gaa ctg gga atg gcc cct

A L Q P T Q G A M P A F A S A F
gcc ctg cag ccc acc cag ggt gcc atg ccg gcc ttc gcc tct gct ttc

Q R R A G G V L V A S H L Q S F
cag cgc cgg gca gga ggg gtc ctg gtt gct agc cat ctg cag agc ttc

L E V S Y R V L R H L A Q P
ctg gag gtg tgc tac cgc gtt cta cgc cac ctt gcg cag ccc

【도 2】

pUC19-G-CSF

NdeI과 BamHI를 가진 올리고머로 PCR

Nde I & BamH I 절단

NdeI G-CSF BamH I

T4 DNA 리가아제

pT-CSF

pET-14b

BamH I

Nde I

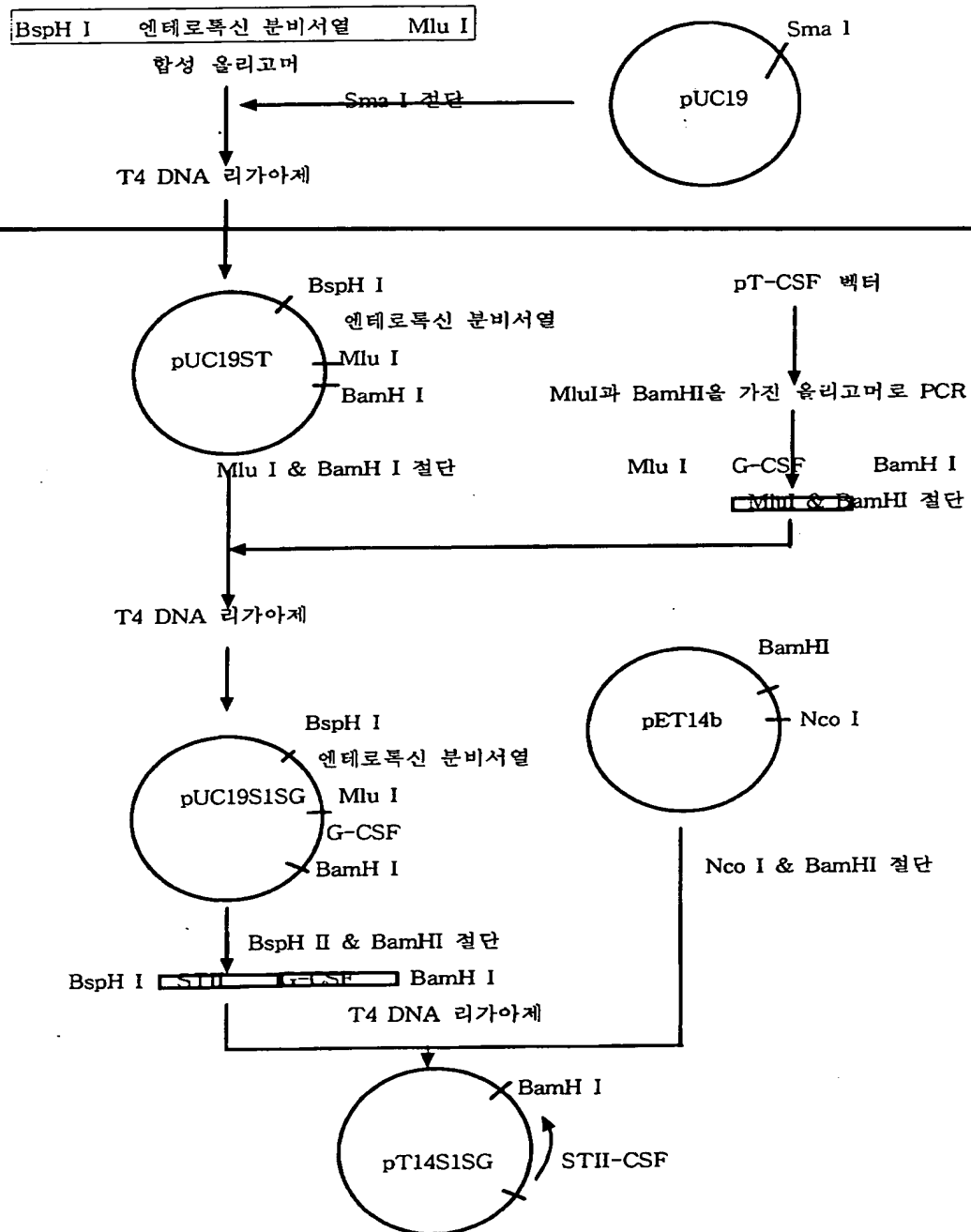
Nde I & BamH I 절단

BamH I

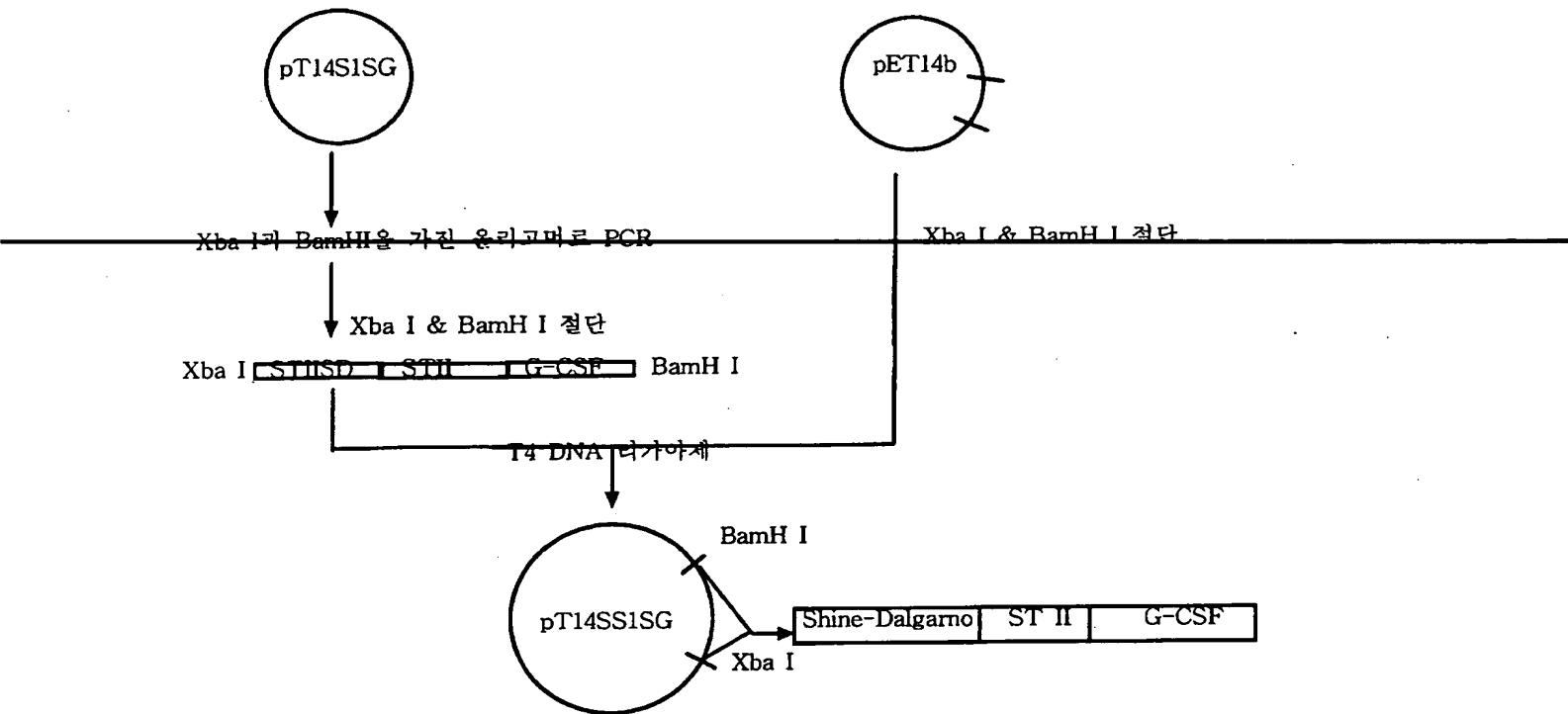
G-CSF

Nde I

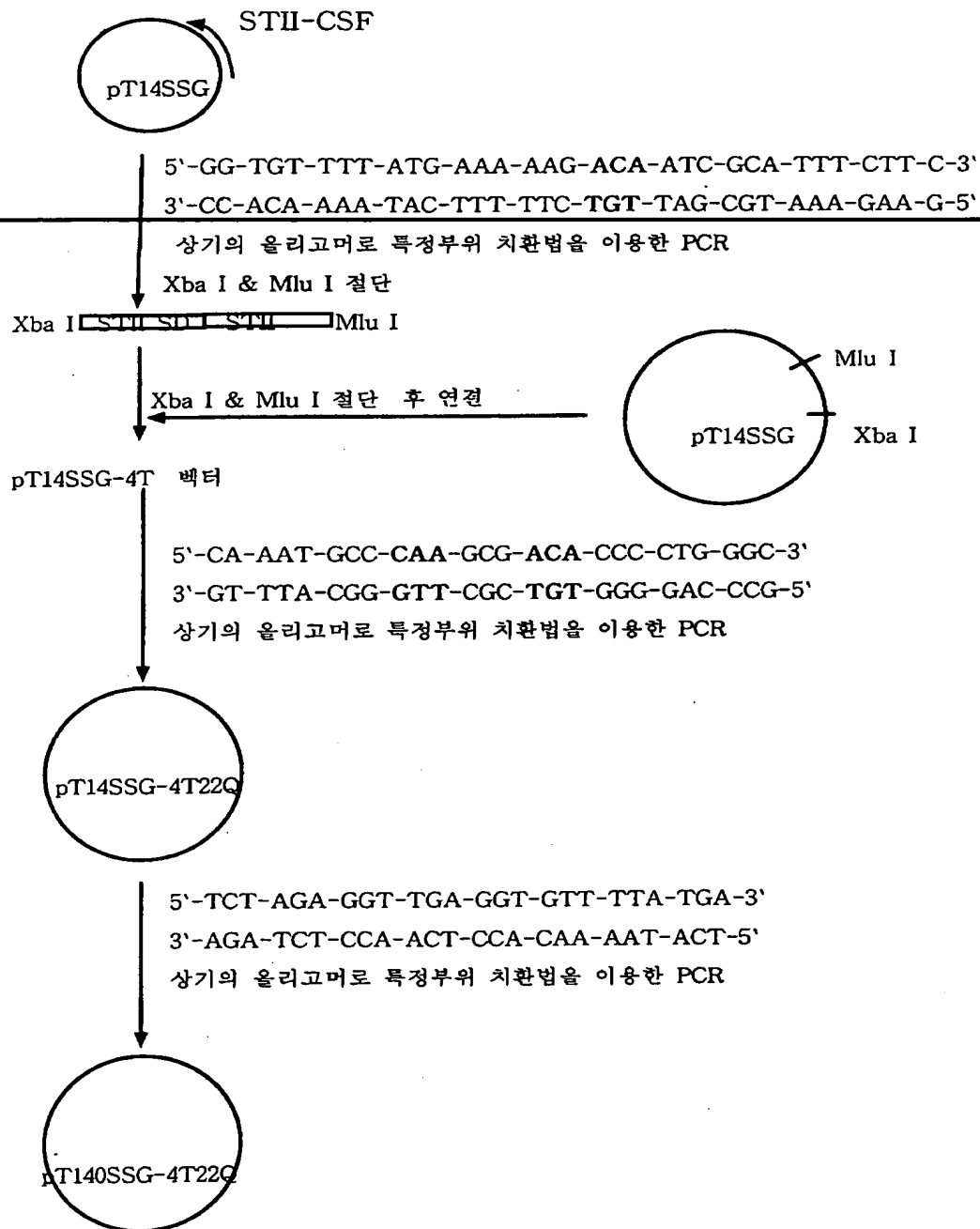
【도 3】



【도 4】



【도 5】



pT14SS1SG

G CSE

+5 +10 +15

S P L G P A S S L P Q S F L L K

tct ccc ctg ggc c et gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag

aga ggc gac c cg gga cgg tcg agg gac ggg gtc tcg aag gac gag ttc

Apa I 위치

+20 +25 +30

C L E Q V R K I Q G D G A A L Q

tgc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc g at ggc gca gcg ctc cag

acg aat ctc gtt cac tcc ttc tag gtc ccg cta cgg cgt cgc gag gtc

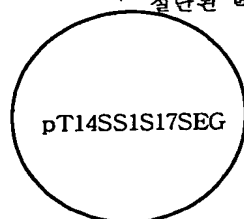
BstX I 위치

↓

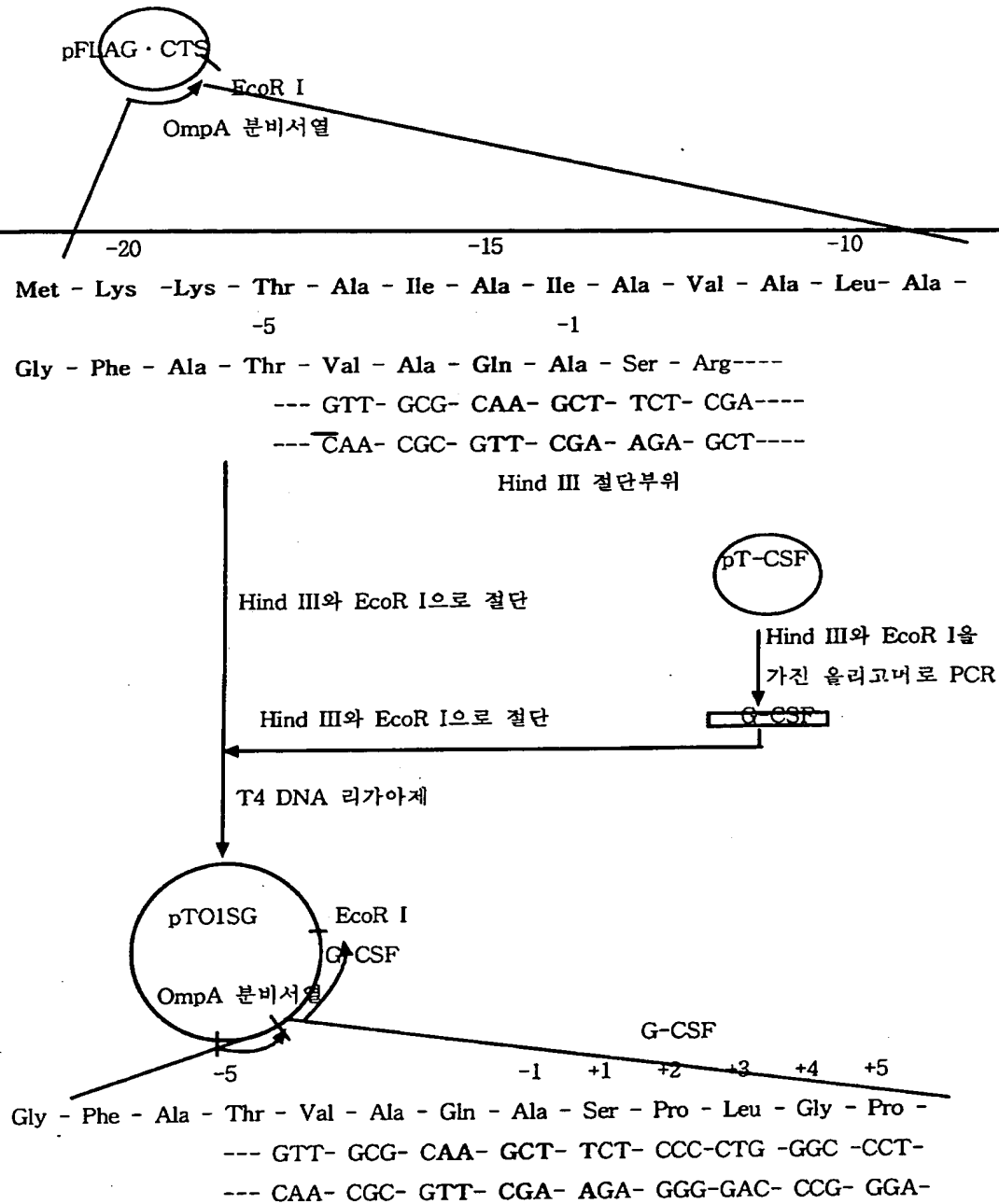
Apa I 과 BstX I으로 절단 후 벡터 단편 회수

5' -CA-GCC-TCT-TCT-CTT-CCA-CAA-TCT-TTC-CTT-CTT-AAG-TCT-CTT-GAA-CAA
3' -CCG-GGT-CGG-AGA-AGA-GAA-GGT-GTT-AGA-AAG-GAA-GAA-TTC-AGA-GAA-CTT-GTT
-GTT-AGA-AAG-ATC-CAA-GGC-G-3' -
-CAA-TCT-TTC-TAG-GTT-5' -

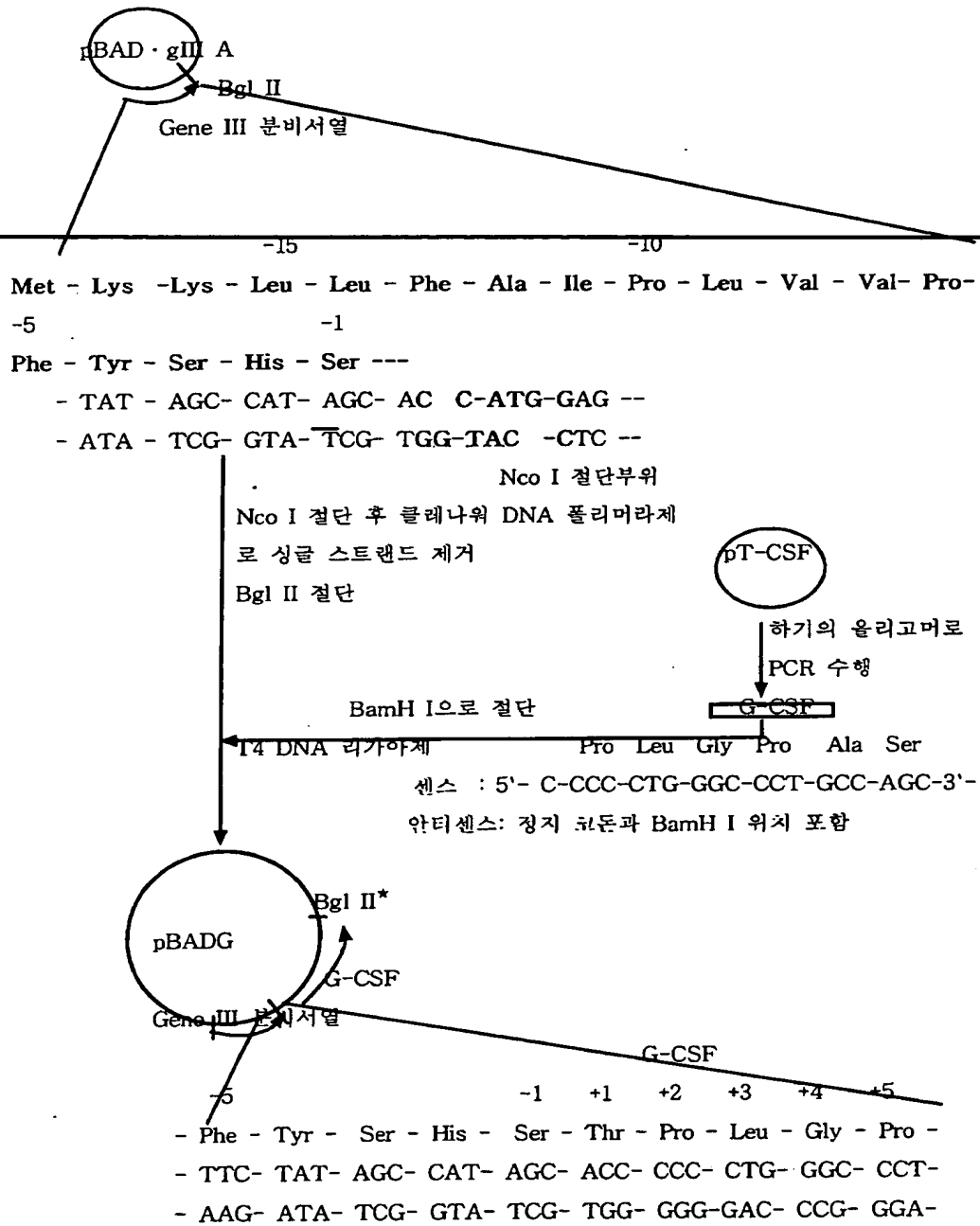
상기의 합성 올리고머를 어닐링 시킨 후 상기의 Apa I과 BstX I으로 절단된 벡터 단편과 연결



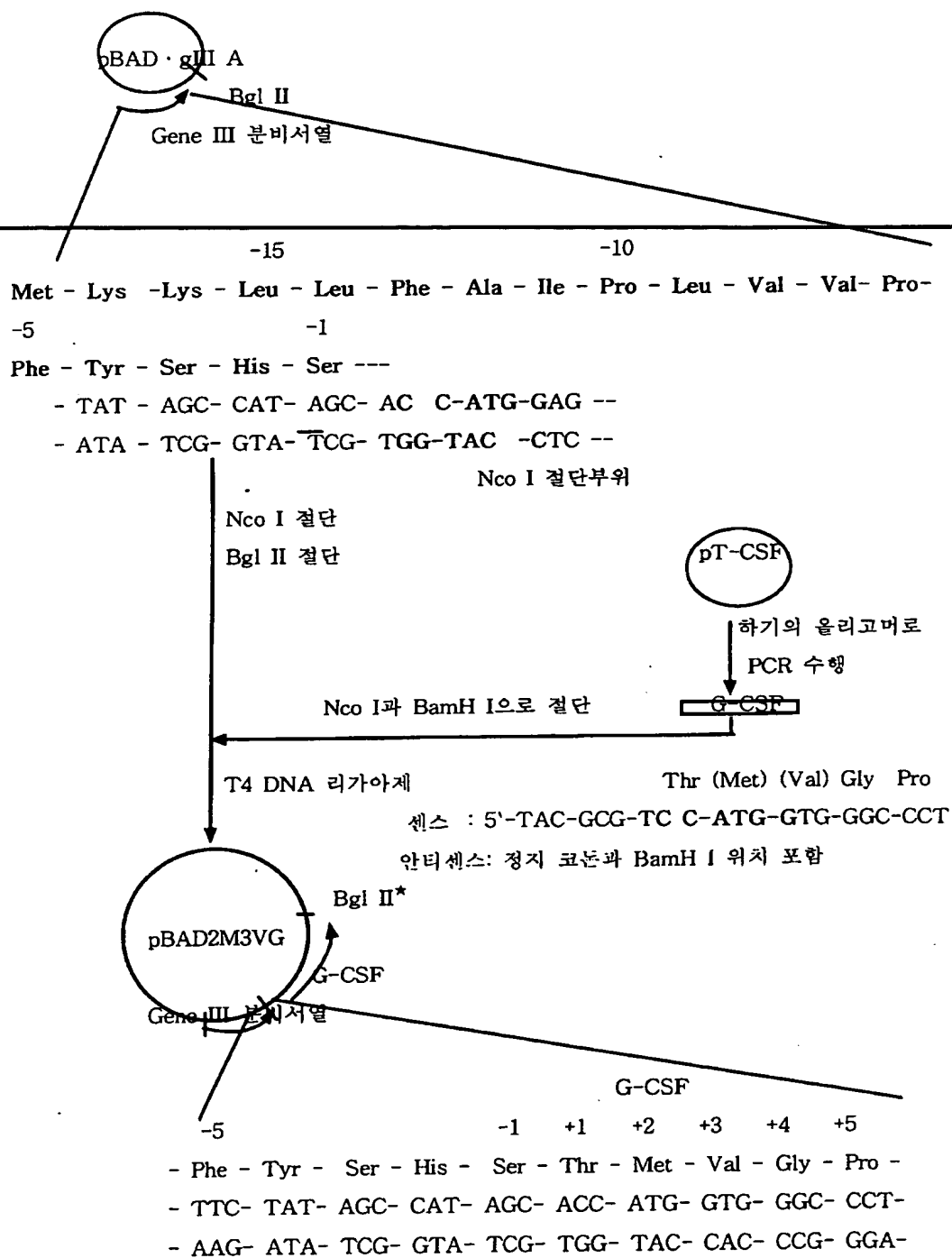
【도 7】



【도 8】

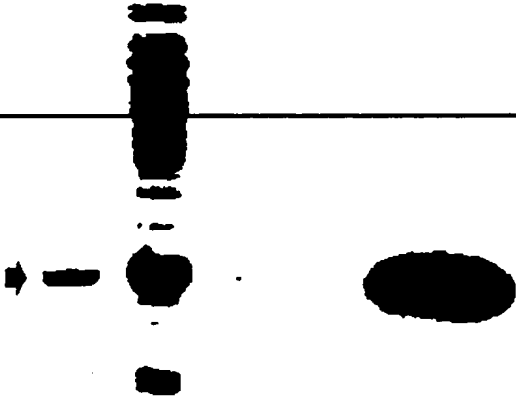


【도 9】



【図 10a】

1 2 3

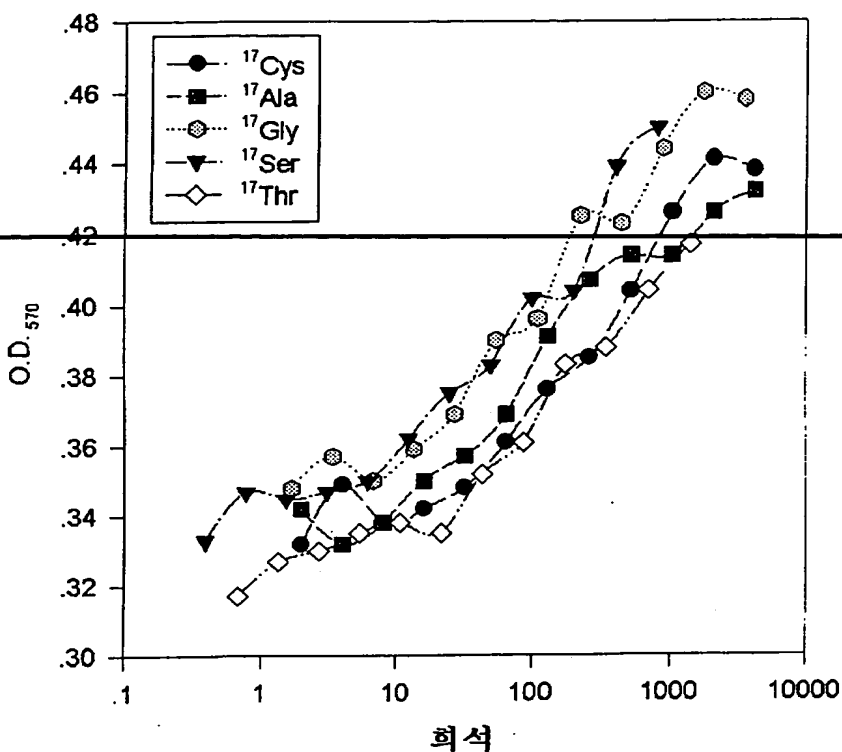


【図 10b】

1 2



【도 11】



【서열목록】

<110> Hanmi Pharm. Co., Ltd. <120> Modified human granulocyte-colony stimulating factor and process for producing same <130> hmy-0174 <160> 64 <170> KOPATIN 1.0 <210> 1 <211> 522 <212> DNA <213> Homo sapiens <220> <221> CDS <222> (1)..(522) <400> 1 aca ccc ctg ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag
48 Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1
5 10 15 tgc tta gag caa gtg agg aag atc cag
ggc gat ggc gca gcg ctc cag 96 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp
Gly Ala Ala Leu Gln 20 25 30

1019990027418

2000/6/2

gag aag ctg tgt gcc acc tac aag ctg tgc cac ccc gag gag ctg gtg 144 Glu Lys
 Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val 35
 40 45 ctg ctc gga cac tct ctg ggc atc ccc tgg gct cc
 ctg agc tcc tgc 192 Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser
 Ser Cys 50 55 60 ccc ag
 cag gcc ctg cag ctg gca ggc tgc ttg agc caa ctc cat agc 240 Pro Ser Gln Ala
 Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser 65 70
 75 80 ggc ctt ttc ctc tac cag ggg ctc ctg cag gcc ctg gaa ggg at
 tcc 288 Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
 85 90 95 ccc gag ttg ggt ccc acc ttg gac ac
 ctg cag ctg gac gtc gcc gac 336 Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln
 Leu Asp Val Ala Asp 100 105 110
 ttt gcc acc acc atc tgg cag cag atg gaa gaa ctg gga atg gcc cct 384 Phe Ala
 Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro 115
 120 125 gcc ctg cag ccc acc cag ggt gcc atg ccg gcc
 ttc gcc tct gct ttc 432 Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala
 Ser Ala Phe 130 135 140 ca
 cgc cgg gca gga ggg gtc ctg gtt gct agc cat ctg cag agc ttc 480 Gln Arg Arg
 Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe 145 150
 155 160 ctg gag gtg tgc tac cgc gtt cta cgc cac ctt gcg cag ccc
 522 Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

2000/6/2

69-56

Sequence <220> <223> Oligonucleotide primer for the C-terminal of

hG-CSF <400> 4 accgaattcg gatactcagg gctgcgcaag gtggcg

36 <210> 5 <211> 72 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Oligonucleotide for preparing enterotoxin

secretory sequence <400> 5 tcatgaaaaa gaatatcgca tttcttcttg catctatgtt

cgtttttct attgctacaa 60 atgcctacgc gt

72 <210> 6 <211> 72 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Oligonucleotide for preparing enterotoxin

secretory sequence <400> 6 acgcgtaggc attgtagca atagaaaaa cgaacataga

tgcaagaaga aatgcgatat 60 tctttttcat ga

72 <210> 7 <211> 39 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Oligonucleotide primer coding for the N-terminal

of [Ser1]hG-CSF <400> 7 acaaatgcct acgcgtctcc cctgggcct gccagctcc

39 <210> 8 <211> 42 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Oligonucleotide primer coding for the C-terminal

of [Ser1]hG-CSF <400> 8 accgaattcg gatactcagg gctgcgcaag gtggcgtaga ac

42 <210> 9 <211> 65 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Oligonucleotide primer for Shine-Dalgarno

sequence of E.coli enterotoxin secretory sequence <400> 9 cggtttccct

ctagaggttg aggtgtttta tgaaaaagaa tatcgcat ttctttgcat 60 ctatg

65 <210> 10 <211> 45 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Oligonucleotide primer for the C-terminal of
 [Ser1]hG-CSF <400> 10 accgaattcg gatcctcagg gctgcgcaag gtggcgtaga acgcg
 45 <210> 11 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial
 Sequence <220> <223> Last five amino acids of E. coli enterotoxin

secretory sequence plus the 1st to the 5th amino acids of hG-CSF <400> 11
 Thr Asn Ala Tyr Ala Thr Pro Leu Gly Pro 1 5 10
 <210> 12 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> Oligonucleotide for preparing [Thr1]hG-CSF
 <400> 12 acaaatgcct acgcgacacc cctgggccct
 30 <210> 13 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> Oligonucleotide for preparing [Thr1]hG-CSF
 <400> 13 agggcccagg ggtgtcgcgt aggcatttgt
 30 <210> 14 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial
 Sequence <220> <223> N-terminal sequence of enterotoxin secretory
 sequence having threonine as the 4th amino acid <400> 14 Met Lys Lys Thr 11
 Ala Phe Leu 1 5 <210> 15 <211> 33
 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Oligonucleotide for substituting the 4th amino acid of enterotoxin secretory sequenc
 with threonine <400> 15 ggtgttttat gaaaaagaca atcgcatttc ttc
 33 <210> 16 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> Antisense of SEQ ID No: 15 <400> 16

gaagaaatgc gattgtcttt ttcataaaac acc

33

<210> 17 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial

Sequence <220> <223> C-terminal sequence of enterotoxin secretory

sequence having glutamine as the 22nd amino acid <400> 17 Asn Ala Gln Ala

Thr Pro Leu Gly 1 5 <210> 18 <211> 26

<212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Oligonucleotide for substituting the 22nd amino acid of enterotoxin secretory

sequence with glutamine <400> 18 caaatgccca agcgacaccc ctgggc

26 <210> 19 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Antisense of SEQ ID NO: 18 <400> 19

gccaggggt gtcgcttggg catttg 26

<210> 20 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Oligonucleotide for modifying Shine-Dalgarno

sequence of the enterotoxin secretory sequence <400> 20 tctagaggtt

gaggtgtttt atga 24 <210> 21

<211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>

<223> Antisense of SEQ ID NO: 20 <400> 21 tcataaaaca cctcaacctc

taga 24 <210> 22 <211>

66 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

S1 oligomer having E. coli preferred nucleotide sequence coding for the 6th to 26th

amino acids of [Ser17]hG-CSF <400> 22 cagcctcttc tcttcacaa tctttccttc

ttaagtctct tgaacaagtt agaaagatcc 60 aaggcg
 66 <210> 23 <211> 66 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> Antisense of SEQ ID NO: 22 (AS1 oligomer)
 <400> 23 ccgggtcgga gaagagaagg tgtagaaag gaagaattca gagaacttgt tcaatctttc

 60 taggtt 66
 <210> 24 <211> 23 <212> PRT <213> Artificial
 Sequence <220> <223> E. coli OmpA secretory sequence plus the 1st and
 the 2nd amino acids of [Ser1]hG-CSF <400> 24 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Il
 Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala 1 5 10
 15 Thr Val Ala Gln Ala Ser Arg 20 <210> 25
 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
 <223> Oligonucleotide containing Hind III recognision site <400> 2
 gttgcgcaag cttctcga 18
 <210> 26 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> Antisense of SEQ ID NO: 25 <400> 26
 tcgagaagct tgcgcaac 18
 <210> 27 <211> 39 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> Oligonucleotide for the N-terminal of [Ser1]
 hG-CSF <400> 27 gttgcgcaag cttctcccct gggccctgcc agctccctg
 39 <210> 28 <211> 39 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> Oligonucleotide for the C-terminal of

[Ser1]hG-CSF <400>; 28 accgaattct cagggtgcg caaggtggcg tagaacgcg

39 <210>; 29 <211>; 13 <212>; PRT <213>; Artificial
Sequence <220>; <223>; OmpA secretory sequence plus the 1st to the 5th
amino acids of [Ser1]hG-CSF <400>; 29 Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ser Pr

Leu Gly Pro 1 5 10 <210>; 30

<211>; 30 <212>; DNA <213>; Artificial Sequence <220>;

<223>; Oligonucleotide for preparing [Thr1]hG-CSF <400>; 30

accgttgcgc aagctacacc cctgggcctt 30

<210>; 31 <211>; 30 <212>; DNA <213>; Artificial

Sequence <220>; <223>; Antisense of SEQ ID NO: 30 <400>; 31

agggccccagg ggtgtagctt gcgcaacggt 30

<210>; 32 <211>; 33 <212>; DNA <213>; Artificial

Sequence <220>; <223>; Oligonucleotide for preparing [Ser17]hG-CSF

<400>; 32 agcttcctgc tcaagtcttt agagcaagtg agg

33 <210>; 33 <211>; 33 <212>; DNA <213>; Artificial

Sequence <220>; <223>; Antisense of SEQ ID NO: 32 <400>; 33

cctcacttgc tctaaagact tgagcaggaa gct 33

<210>; 34 <211>; 33 <212>; DNA <213>; Artificial

Sequence <220>; <223>; Oligonucleotide for preparing [Thr1]hG-CSF

<400>; 34 agcttcctgc tcaagacctt agagcaagtg agg

33 <210>; 35 <211>; 33 <212>; DNA <213>; Artificial

Sequence <220> <223> Antisense of SEQ ID NO: 34 <400> 35

cctcacttgc tctaaggtct tgagcaggaa gct 33

<210> 36 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Oligonucleotide for preparing [Ala17]hG-CSF

<400> 36 agcttcctgc tcaaggcctt agagcaagtg agg

33 <210> 37 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Antisense of SEQ ID NO: 36 <400> 37

cctcacttgc tctaaggcct tgagcaggaa gct 33

<210> 38 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Oligonucleotide for preparing [Gly17]hG-CSF

<400> 38 agcttcctgc tcaaggcctt agagcaagtg agg

33 <210> 39 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Antisense of SEQ ID NO: 38 <400> 39

cctcacttgc tctaaggcct tgagcaggaa gct 33

<210> 40 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Oligonucleotide for preparing [Asp17]hG-CSF

<400> 40 agcttcctgc tcaaggactt agagcaagtg agg

33 <210> 41 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Antisense of SEQ ID NO: 40 <400> 41

cctcacttgc tctaagtcct tgagcaggaa gct 33

<210> 42 <211> 18 <212> PRT <213> Escherichia

coli <220> <221>; PEPTIDE <222>; (1)..(18) <223>; Gene
 III secretory sequence <400>; 42 Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val
 Val Pro Phe Tyr Ser 1 5 10 15
 His Ser <210>; 43 <211>; 21 <212>; DNA <213>;

Artificial Sequence <220> <223>; Oligonucleotide containing Nco I
 recognition site <400>; 43 tatagccata gcaccatgga g

21 <210>; 44 <211>; 21 <212>; DNA <213>; Artificial
 Sequence <220> <223>; Antisense of SEQ ID NO: 43 <400>; 44
 ctccatggtg ctatggctat a 21

<210>; 45 <211>; 8 <212>; PRT <213>; Artificial
 Sequence <220> <223>; The 2nd to the 10th amino acids of hG-CSF
 <400>; 45 Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu 1 5

<210>; 46 <211>; 25 <212>; DNA <213>; Artificial
 Sequence <220> <223>; Nucleotide sequence coding for the 2nd to the
 10th amino acids of hG-CSF plus an additional cytosine at its 5'-end <400>;
 46 ccccttgggc cctgccagct ccctg 25

<210>; 47 <211>; 25 <212>; DNA <213>; Artificial
 Sequence <220> <223>; Antisense of SEQ ID NO: 46 <400>; 47
 cagggagctg gcagggccca ggggg 25

<210>; 48 <211>; 10 <212>; PRT <213>; Artificial
 Sequence <220> <223>; Gene III secretory sequence plus the 1st to the

5th amino acids of hG-CSF <400> 48 Phe Tyr Ser His Ser Thr Pro Leu Gly Pro
 1 5 10 <210> 49 <211> 9 <212>
 PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> The 1st to the 9th
 amino acids of [Met2,Val3]hG-CSF <400> 49 Thr Met Val Gly Pro Ala Ser Ser

Leu 1 5 <210> 50 <211> 33
 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Oligonucleotide for preparing [Met2,Val3]hG-CSF <400> 50 tacgcgtcca
 tgggtgggccc tgccagctcc ctg 33 <210> 51
 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
 <223> Antisense of SEQ ID NO: 50 <400> 51 cagggagctg gcagggccca
 ccatggacgc gta 33 <210> 52 <211>
 10 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Gene III secretory sequence plus the 1st to the 5th amino acids of [Met2,Val3]hG-CSF
 <400> 52 Phe Tyr Ser His Ser Thr Met Val Gly Pro 1 5
 10 <210> 53 <211> 23 <212> PRT <213> Escherichia
 coli <220> <221> SIGNAL <222> (1)..(23) <223>
 Thermostable enterotoxin secretory sequence <400> 53 Met Lys Lys Asn Ile Al
 Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser 1 5 10
 15 Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala 20 <210> 54
 <211> 23 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220>
 <223> Modified thermostable enterotoxin secretory sequence <400> 5

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser 1 5

10 15 Ile Ala Thr Asn Ala Gln Ala 20

<210> 55 <211> 96 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> Nucleotide sequence coding for the 1st to 32nd

amino acids of [Ser1, Ser17]hG-CSF <220> <221> CDS <222>

(1)..(96) <400> 55 tct ccc ctg ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg

ctc aag 48 Ser Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1 5 10 15 tct tta gag caa gtg

agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag 96 Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys

Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln 20 25

30 <210> 56 <211> 32 <212> PRT <213>

Artificial Sequence <400> 56 Ser Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser

Phe Leu Leu Lys 1 5 10 15 Ser

Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln 20

25 30 <210> 57 <211> 96 <212> DN

<213> Artificial Sequence <220> <223> Nucleotide sequence

coding for the 1st to the 32nd amino acids of [Ser1]hG-CSF <220> <221>

CDS <222> (1)..(96) <400> 57 tct ccc ctg ggc cct gcc agc tcc ctg

ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48 Ser Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln

Ser Phe Leu Leu Lys 1 5 10 15

tgc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag 96 Cys Leu

Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln 20

25 30 <210> 58 <211> 32 <212> PRT

<213> Artificial Sequence <400> 58 Ser Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu

Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5 10

15 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30 <210> 59 <211>

96 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Nucleotide sequence coding for the 1st to the 32nd amino acids of [Ser17]hG-CSF

<220> <221> CDS <222> (1)..(96) <400> 59 aca ccc ct

ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48 Thr Pro Leu Gly Pro

Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5

10 15 tct tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gc

ctc cag 96 Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30 <210> 60 <211> 3

<212> PRT <213> Artificial Sequence <400> 60 Thr Pro Leu Gly Pr

Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5 10

15 Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30 <210> 61 <211>

96 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Nucleotide sequence coding for the 1st to the 32nd amino acids of [Thr17]hG--CSF

<220> <221> CDS <222> (1)..(96) <400> 61 aca ccc ct

ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48 Thr Pro Leu Gly Pro
 Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5
 10 15 acc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gc
 ctc cag 96 Thr Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30 <210> 62 <211> 3

<212> PRT <213> Artificial Sequence <400> 62 Thr Pro Leu Gly Pr

Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5 10

15 Thr Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30 <210> 63 <211>

96 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Nucleotide sequence coding for the 1st to the 32nd amino acids of [Ala17]hG-CSF

<220> <221> CDS <222> (1)..(96) <400> 63 aca ccc ct

ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48 Thr Pro Leu Gly Pro

Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5

10 15 gcc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gc

ctc cag 96 Ala Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30 <210> 64 <211> 3

<212> PRT <213> Artificial Sequence <400> 64 Thr Pro Leu Gly Pr

Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5 10

15 Ala Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30 <210> 65 <211>

96 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Nucleotide sequence coding for the 1st to the 32th amino acids of [Gly17]hG-CSF

<220> <221> CDS <222> (1)..(96) <400> 65 aca ccc ct

ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48 Thr Pro Leu Gly Pro

Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5

10 15 ggc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gc

ctc cag 96 Gly Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30 <210> 66 <211> 3

<212> PRT <213> Artificial Sequence <400> 66 Thr Pro Leu Gly Pr

Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5 10

15 Gly Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30 <210> 67 <211>

96 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Nucleotide sequence coding for the 1st to the 32nd amino acids of [Met2, Val3]hG-CSF

<220> <221> CDS <222> (1)..(96) <400> 67 aca atg gt

ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48 Thr Met Val Gly Pro

Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5

10 15 tgc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gc

ctc cag 96 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30 <210> 68 <211> 3

<212> PRT <213> Artificial Sequence <400> 68 Thr Met Val Gly Pr

Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5 10
 15 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
 20 25 30 <210> 69 <211>
 96 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Nucleotide sequence coding for the 1st to the 32nd amino acids of [Met2, Val3,

Ser17]hG-CSF <220> <221> CDS <222> (1)..(96) <400>

69 aca atg gtc ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48 Thr Me

Val Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5

10 15 tct tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gc

ctc cag 96 Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30 <210> 70 <211> 3

<212> PRT <213> Artificial Sequence <400> 70 Thr Met Val Gly Pr

Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5 10

15 Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30 <210> 71 <211>

10 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Shine-Dalgarno sequence <400> 71 gaggtgtttt

10